

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
3. Mai 2001 (03.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/31057 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10209  
(22) Internationales Anmeldeatum: 17. Oktober 2000 (17.10.2000)  
(25) Einreichungssprache: Deutsch  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch  
(30) Angaben zur Priorität:  
199 50 969.7 22. Oktober 1999 (22.10.1999) DE  
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO KG [DE/DE]; 65926 Frankfurt am Main (DE).



(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MUTH, Jochen

[DE/DE]; Magnolienstrasse 3, 65929 Frankfurt am Main (DE). WINDHAB, Norbert [DE/DE]; Akazienstrasse 28, 65795 Hattersheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, BR, CA, JP, KR, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

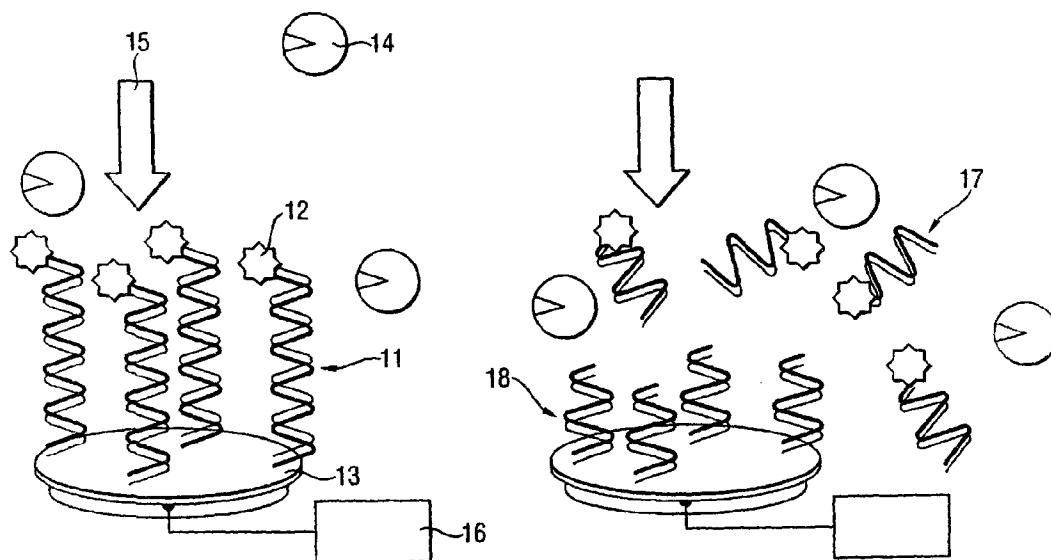
**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DOUBLE-STRAND NUCLEIC ACID PROBES AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: DOPPELSTRANG-NUKLEINSÄURE-SONDEN UND DEREN VERWENDUNG



(57) Abstract: The invention relates to electronically-isolable double-strand nucleic acid probes and use thereof for rapid and easy detection of interactions between double-stranded nucleic acids and factors which interact with them either by mediated or direct means. The invention further relates to the production of said double-strand nucleic acids.

**WO 01/31057 A2**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft elektronisch auslesbare Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden und deren Verwendung zum schnellen und einfachen Nachweis von Wechselwirkungen zwischen doppelsträngigen Nukleinsäuren und mit ihnen unmittelbar oder mittelbar interagierenden Faktoren, sowie Verfahren zur Herstellung der Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden.

## Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden und deren Verwendung

### Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft elektronisch auslesbare Doppelstrang-Nukleinsäure-Derivate und deren Verwendung zum schnellen und einfachen Nachweis von Wechselwirkungen zwischen doppelsträngigen Nukleinsäuren und mit ihnen unmittelbar oder mittelbar interagierenden Faktoren, insbesondere mit Proteinen, Peptiden, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäuren oder  
10 nukleinsäureschädigenden Substanzen.

Doppelsträngige Nukleinsäuren spielen in der lebenden Zelle und auch in vielen Viren, insbesondere als Träger der Erbanlagen, eine entscheidende Rolle. Dabei unterliegen sie in natürlichen Systemen, wie z. B. einer Zelle vielfältiger innerer und äußerer Einflüsse. Insbesondere Wechselwirkungen zwischen Proteinen und doppelsträngiger DNA sind von großem Interesse, da solche Wechselwirkungen entscheidenden Einfluß auf die Transkription oder Repression einzelner Gene und damit auf den Phänotyp der entsprechenden Organismen haben. Aber auch die Replikation der Erbanlagen bei der Mitose oder Meiose, die Restriktion z. B. viraler Nukleinsäuren oder die Packung und Entpackung eukaryontischer Nukleinsäuren in den Chromosomen sind weitere wichtige Vorgänge in lebenden Zellen, die durch das komplexe Zusammenspiel von Proteinen und Nukleinsäuren gesteuert werden. Darüber hinaus können auch andere chemische Substanzen mit doppelsträngigen Nukleinsäuren in Wechselwirkung treten, stellvertretend sei hier nur die Klasse der karzinogen wirkenden interkalierenden oder nukleinsäureschädigenden Stoffe aufgeführt. Auch Nukleinsäuren selbst, ob einzelsträngig oder doppelsträngig, können mit ihren doppelsträngigen Verwandten, z. B. bei der Rekombination, Insertion oder Transposition, in Wechselwirkung treten.

30 Bei der Untersuchung solcher Prozesse, egal ob es um die Identifizierung der einzelnen biologisch aktiven Bausteine oder um die Aufklärung der Mechanismen, also dem Zusammenspiel dieser Bausteine, geht, spielt die Kenntnis von Molekül-Molekül-Wechselwirkungen eine zentrale Rolle. Die Entwicklung neuer effizienter

2

Nachweisverfahren für solche Wechselwirkungen stehen folglich im Mittelpunkt des Interesses.

In Napier, M. E. et al. „Probing Biomolecule Recognition with Electron Transfer:

5 Electrochemical Sensors for DNA Hybridization“ Bioconjugate Chem. (1997), 8(6), 906-913 sind bereits Messanordnungen beschrieben, die es erlauben  
Hybridisierungsergebnisse direkt an Einzelstrang Nukleinsäuren messtechnisch zu erfassen. Diese Nachweismethode basiert darauf, daß Guanosin-gebundene DNA über Rutheniumkomplexe oxidiert wird und sich dieser Vorgang mittels  
10 Cyclovoltammetrie nachweisen läßt.

In den Druckschriften WO 95/15971, WO 96/40712 und DE 19901761 A1 werden Verfahren beschrieben, welche die elektrische Leitfähigkeit doppelsträngiger Nukleinsäure-Hybride gegenüber einzelsträngigen Nukleinsäuren ausnutzen. Beide

15 wenden ihr Verfahren an, um ausschließlich Einzelstrang-Nukleinsäuresequenzen nachzuweisen. Dazu werden zum Nachweis des Vorhandenseins einzelsträngiger Nukleinsäure-Zielsequenzen komplementäre einzelsträngige Nukleinsäure-Sonden eingesetzt, die kovalent gebunden wenigstens eine Elektronen-Donor-Einheit und wenigstens eine Elektronen-Akzeptor-Einheit, bevorzugt als Elektrode ausgestaltet,  
20 enthalten. Im elektrisch leitfähigen Sonden-Zielsequenz-Hybrid wird thermisch oder über ein strominduzierendes Signal, wie z. B. Licht, ein nachweisbarer Elektronenfluß erzeugt.

Die geschilderten Methoden sind auf den Nachweis von hybridisierten

25 einzelsträngigen Nukleinsäuren limitiert. Der Nachweis beschränkt sich auf das bloße Vorhandensein einer Zielsequenz im zu untersuchenden Medium und läßt darüber hinaus keine Aussagen über die biologische Aktivität der interagierenden Nukleinsäuren zu.

30 Sollen Wechselwirkungen doppelsträngiger Nukleinsäuresequenzen untersucht werden, muß auf andere Methoden, z. B. auf gelelektrophoretische Verfahren zurückgegriffen werden.

## 3

Bei der Gel-Shift-Methode (Fried, M. & Crothers, D. M. „Equilibrium and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis“ (1981) Nucleic Acid Res. 9, 6505-6525; Garner, M. M. & Revzin, A. „A gel elecrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system“ (1981) Nucleic Acid Res. 9, 3047-3060) wird ein radioaktives DNA-Fragment mit einem zu untersuchenden Proteinextrakt inkubiert. Enthält das Proteinextrakt ein DNA-Fragment bindendes Protein sind geelektrophoretisch zwei Banden nachweisbar, eine repräsentiert das freie DNA-Fragment, die zweite, verschobene Bande enthält den DNA-Fragment-Protein-Komplex.

Eine weitere in vitro Methode zum Nachweis von DNA-Protein-Bindungen bildet die Footprint-Technik (Watson, J. D. et al, Rekombinierte DNA, 2. Auflage 1993, S. 143-146, Spektrum Akademischer Verlag). Dabei wird eine radioaktiv markierte DNA-Sequenz einem unvollständigen Restriktionsabbau, z. B. mit DNase I unterworfen. Durch ein gebundenes Protein wird die Sequenz an der entsprechenden Stelle vor dem Abbau geschützt, gegenüber der freien Sequenz fehlen beim elektrophoretischen Fragmentnachweis die entsprechenden Banden.

Diese Methoden beinhalten die Präparierung der DNA-Fragmente und der Proteinextrakte, die Markierung der DNA-Fragmente, die Bildung eines Reaktionsansatzes und die geelektrophoretische Trennung. Die Durchführung dieser unerlässlichen Nachweisschritte ist in der Anwendung sehr arbeitsaufwendig und zeitintensiv. Darüber hinaus kann der Nachweis nicht durchgängig unter nativen Bedingungen durchgeführt werden und eine Verwendung geelektrophoretisch aufgetrennter Reaktionsgemischbestandteile für weitere Untersuchungen gestaltet sich schwierig.

Davon ausgehend liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde neuartige Sonden zum Nachweis und zur Untersuchung von Interaktionen doppelsträngiger Nukleinsäuren sowie Verfahren zum schnellen und einfachen Nachweis solcher Interaktionen zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird mit Hilfe neuartiger elektronisch auslesbarer Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden gelöst.

Die Sonden enthalten zumindest teilweise doppelsträngig vorliegende Nukleinsäuren

- 5 oder einzelsträngige Nukleinsäuren mit selbsterkennenden Domänen, die an eine leitfähige Oberfläche, bevorzugt an eine Elektrode, z. B. an Feldeffekttransistoren, gebunden sind. Der als Duplex vorliegende Nukleinsäureabschnitt ist mit mindestens einer Elektronen-Donor-Einheit oder alternativ mit mindestens einer Elektronen-Akzeptor-Einheit verknüpft, wobei zumindest ein Teilbereich der zu untersuchenden
- 10 Nukleinsäureregion zwischen der Elektrode und der Elektronen-Akzeptor-Einheit oder Elektronen-Donor-Einheit liegt. Dieser Teilbereich bildet die Detektionsstelle. Die Bindung der einzelnen Sondenuntereinheiten kann kovalent oder über stabile supramolekulare Wechselwirkungen, wie van der Waals Wechselwirkungen, Dipol-Wechselwirkungen, insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen, oder ionische
- 15 Wechselwirkungen erfolgen.

Zum Aufbau der Sonde können alle einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäuren beliebiger Sequenz verwendet werden. Dabei ist es unerheblich ob natürliche, synthetische oder modifizierte Nukleinsäuresequenzen eingesetzt

- 20 werden. Bei der Anbindung einzelsträngiger Nukleinsäure kann der entsprechende Doppelstrang einfach durch Hybridisierung mit einer komplementären Einzelstrang-Nukleinsäure gebildet werden (z. B. McCarthy, B. J. et al., „Specificity of molecular hybridization reaction“ Annu. Rev. Biochem. (1970), 39, 131-150), wobei die Ausbildung eines Doppelstrangs im Falle selbstkomplementären Einzelstrang-
- 25 Nukleinsäuren durch intramolekulare Rückfaltungen hervorgerufen wird. Bei der Synthese solcher einzelsträngiger Nukleinsäuren werden vorteilhaft zwei Domänen mit komplementären Sequenzen kovalent über eine mindestens ein Nukleotid umfassende Brücke, bevorzugt eine aus 4 bis 6 Nukleotiden bestehende Brücke, insbesondere aus Thymin-Nukleotiden, oder über eine artifizielle, mindestens
- 30 einatomige Brücke verknüpft. Solche artifiziellen Brücken sind z. B. Disulfid-Brücken (Hetian Gao et al., „Stabilization of double-stranded oligonucleotides using backbone-linked disulfide bridges“, Nucleic Acid Research, 1995, Vol. 23, No. 2, „85-292), Stilbendicarboxyamid-Brücken (Lewis, F. D. et al., „Distance-depending electron transfer in DNA Hairpins“ Book of abstract 215<sup>th</sup> ACS National Meeting,

Dallas, Bd. 29, S. Physik 255, 1988), Ru-Komplex-Brücken (Lewis, F. D. et al., „Synthesis and spectroscopy of Ru(II)-bridged DNA hairpins“, Chem. Commun., Bd. 4, S. 327, 1999), Hexaethylenglycolbrücken (Durand, M. et al., „Circular dichroism Studies of an Oligonucleotide containing Hairpin Loop made of a Hexaethylen Glycol Chain: Conformation and Stability.“, (1990) Nucl. Acids Res. 18, 6353-6359), aromatische Terephthalimid-Brücken (Salunkhe, M. S. et al., (1992), Control of Folding and Binding of Oligonucleotides by Use of a Non-Nucleotide Linker“, J. Am. Chem. Soc. 114, 8768-8772), unverzweigte oder verzweigte Diol-Brücken, 3`-Amino-Modifier-CPG (GlenResearch), der bevorzugt auf einem Thiolträger aufgebaut wird, oder verzweigte Phosphoramidit-Brücken. Ein großer Vorteil solcher, selbstkomplementäre Sequenzabschnitte enthaltenden, Nukleinsäuren liegt in der einfachen vollsynthetischen Zugänglichkeit der einzelsträngigen Nukleinsäure und der einfachen Herstellbarkeit der doppelsträngigen Sonde aus einer einzigen molekularen Nukleinsäureuntereinheit. Darüber hinaus hat sich gezeigt, daß bei der Herstellung der Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden die intramolekulare Hybridisierung der einzelsträngigen selbstkomplementäre Sequenzabschnitte enthaltenden Nukleinsäuren von der Nukleinsäurekonzentration unabhängig erfolgt. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, daß die Herstellung enzymfrei erfolgen kann. Ein weiterer Vorteil ist somit, daß die Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden auch unter denaturierenden Bedingungen präpariert werden können. Eine Hairpin bildende einzelsträngige Sequenz mit freiem 3`OH-Ende kann auch mit Hilfe einer DNA- oder RNA-Polymerase, z. B. einer Klenow- oder Taq-Polymerase, zu der entsprechenden Nukleinsäure-Duplex vervollständigt werden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Sonden können z. B. natürliche oder synthetische DNAs, cDNAs oder RNAs verwendet werden. Ebenso verwendbar sind deren Hybride und deren modifizierte Derivate. Zu den modifizierten Derivaten gehören insbesondere Nukleinsäuren die am Zucker veränderte Nukleotide, wie 2`O-Methyl-Nukleotide oder 2`O-Allyl-Nukleotide, enthalten. Eine Modifizierung der Phosphat-Gruppe, wie z. B. zum Phosphoramid, Phosphorthioat oder Methylphosphonat, ist ebenfalls möglich. Es können auch Nukleinsäuren verwendet werden die keinen oder einen nicht in natürlichen Nukleinsäuren vorkommenden Zucker enthalten, wie z. B. die Peptidyl-Nukleinsäuren oder die Pyranosyl-Nukleinsäuren. Neben den am Zucker-Phosphat-Rückgrat veränderten

6

Nukleinsäuren können auch Nukleinsäuren als Sondenbestandteil eingesetzt werden die nicht natürlich vorkommende Nukleotide, wie Xanthin, Hypoxanthin oder Inosin, enthalten.

5 Bevorzugt werden doppelsträngige DNA oder RNA Nukleinsäuresequenzen in die Sonden eingebaut. Von besonderem Interesse sind natürlich vorkommende Proteine oder Peptide bindende DNA-Sequenzen, insbesondere bei der Genregulation beteiligte DNA-Sequenzen, wie z. B. Operator- oder Promotorsequenzen. Je nach Anwendungsproblem kann der Einsatz von Consensus-Sequenzen bzw. Allel  
10 spezifischer oder Organismus spezifischer Sequenzen, zweckmäßig sein.

Die Länge der Nukleinsäure-Sequenz zwischen der Elektrode und den Elektronen-Donor-Einheiten bzw. Elektronen-Akzeptor-Einheiten liegt vorzugsweise zwischen 2 und 100 Basenpaaren, besonders bevorzugt zwischen 5 und 50 Basenpaaren. Der  
15 doppelsträngige Bereich muß bis zum Nukleinsäure-Elektroden Linker reichen, um einen Elektronenfluß zu gewährleisten. Einzelsträngige Bereiche können über die doppelsträngige, zwischen der Elektrode und den Elektronen-Donor-Einheiten bzw. Elektronen-Akzeptor-Einheiten liegenden Detektionsregion hinaus reichen. Die doppelsträngige Detektionsregion kann Einzelstrangbrüche im Zucker-Phosphat-  
20 Rückgrat enthalten.

Die Ausbildung eines Doppelstranges kann durch chemische Modifikationen, die zu inter- oder intramolekularen Brückenbindungen führen, wie z. B. Disulfidbrücken, oder andere nicht natürliche Stranguntereinheiten chemisch stabilisiert werden. Eine  
25 weitere Möglichkeit der Stabilisierung der Nukleinsäureduplexabschnitte bietet die gezielte Einführung von Thymin-Nukleotiden auf zwei gegenüberliegende Positionen in der Duplex und anschließender strahlungsinduzierte Thymidinbrückenbildung. Analog können auch Azidonukleotide bzw. Psoralen-Derivate zur photoinduzierten Brückenbildung herangezogen werden (Fabrega, C. et al., „Studies on the Synthesis  
30 of Oligonucleotides Containing Photoreactive Nucleosides: 2-Azido-2'-Deoxyinosine and 8-Azido-2'-Deoxyadenosine“, Biol. Chem., Vol. 379, 527-433, 1998; Pieles, U. et al., Nucleic Acid Research 1989, 17, 285). So kann beispielsweise der Abbau der Nukleinsäure-Duplex durch Exonukleasen verhindert werden. Die Empfindlichkeit der doppelsträngigen Nukleinsäuren gegenüber unerwünschten,

verfahrensbedingten Einflüssen wie der Temperatur des zu untersuchenden Mediums wird ebenfalls gesenkt.

Als Elektronen-Donor-Einheiten oder Elektronen-Akzeptor-Einheiten können alle

- 5 Moleküle, Molekülteile oder Oberflächen wirken, die in der Lage sind aus ihrem Grundzustand oder aus einem angeregten Zustand Elektronen abzugeben bzw. im Grundzustand oder in einem aktivierte Zustand Elektronen aufzunehmen. Die Anregung einer Elektronen-Donor-Einheit kann z. B. durch Lichteinstrahlung oder Ionisierung erfolgen, die Aktivierung eines Elektronenakzeptors kann z. B. durch Ionisierung ebenfalls mittels Licht oder mittels chemischer Ionisation erfolgen.
- 10 Bewährte Elektronen-Donoren und -Akzeptoren sind z. B. Metallkomplexe oder organische redoxaktive Verbindungen, wie sie in der Patentanmeldung WO 96/40712 beschrieben sind oder natürlich vorkommende oder modifizierte photoinduzierbare redoxaktive Reaktionszentren wie sie z. B. in der
- 15 Patentanmeldung DE 19901761 A1 verwendet werden. Aber auch elektrisch leitende Oberflächen, insbesondere Elektroden, können als Donor- oder Akzeptoreinheit genutzt werden. Insbesondere der Einsatz von Ferrocen oder PQQ als Elektronen-Donor-Einheiten hat sich experimentell bewährt.
- 20 Die kovalent gebundenen Elektronen-Donor-Einheiten oder Elektronen-Akzeptor-Einheiten können in multimolekulare Elektronen-Transfer-Systemen eingebunden sein. Zum einen kann die in der Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonde wirkende Elektronen-Donor-Einheit (Elektronen-Akzeptor-Einheiten) über gelöste Elektronenspender wie z.B. Anionen (Kationen) regenerierbar aufgeladen werden,
- 25 wobei ein geschlossener Stromkreis mit den Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden als Widerstand aufgebaut wird. Zum anderen können, analog zu den natürlich vorkommenden Reaktionszentren, wie z. B. dem Chlorophyll, auch weitere redoxaktive Elektronentransfer-Einheiten mit der kovalent gebundenen Elektronen-Donor- oder -Akzeptor-Einheit assoziiert sein.
- 30 Bevorzugt sind induzierbare und/oder regenerative Donor- oder Akzeptor-Einheiten. Regenerative Systeme ermöglichen einen kontinuierlichen Elektronenfluß durch die Nukleinsäure Duplex, während bei induzierbaren Systemen der Elektronenfluß durch den Induktor zeitlich kontrollierbar ist.

## 8

Werden z. B. Chlorophyll, Bakteriochlorophyll oder dessen modifizierte Derivate als Elektronen-Donor-Systeme eingesetzt lässt sich der Elektronenfluß analog zu den natürlichen Photosynthese-Prozessen durch Lichteinstrahlung induzieren. Über geeignete Elektronen spendende gelöste Substanzen, wie z. B.  $\text{Fe}(\text{CN})_4^{3-}$  oder

5  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  können die Reaktionszentren wieder regeneriert werden. Die Induktion kann auch direkt über chemische Substanzen erfolgen die Elektronen auf die Elektronen-Donor-Einheiten übertragen oder Elektronen den Elektronen-Akzeptor-Einheiten entziehen.

10 Die Anbindung der Nukleinsäuren an die Elektrode kann z.B. über eine Thiolgruppe (Chidsey, C.E.D., Sience, V. 251, S. 919, (1991)) bzw. über Phosphorothioate oder Phosphorodithioate an eine Goldoberfläche erfolgen. Aber auch eine Anbindung über gut leitende Molekül-Linker (z. B. beschrieben von Kayyem et al. in WO 98/20162), die bevorzugt konjugierte Doppelbindungssysteme enthalten und eine 15 höhere Leitfähigkeit als die angebundenen Nukleinsäure besitzen, ist möglich. Die Verwendung von Linkern mit konjugierten Doppelbindungssystemen erlaubt eine Elektronenleitung entlang der Linkerstruktur auf die Elektrodenoberfläche. Das ermöglicht auf elegante weise eine Passivierung der freibleibenden Elektrodenoberfläche. Die Anbindung der Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden kann 20 an eine unstrukturierte, zusammenhängende Elektrodenoberfläche oder an einer strukturierten, z. B. matrizenförmigen Elektroden-Array-Oberfläche erfolgen. Die Strukturierung erfolgt so, daß die einzelnen Arraypositionen der Elektrode unabhängig voneinander ausgelesen werden können. Den einzelnen Arraypositionen können Nukleinsäure-Sonden mit spezifischen Sequenzen 25 zugewiesen werden oder es kann eine Kompartimentierung des Reaktionsraumes erfolgen. So ist bei der elektronischen Auslesung der Elektrode ein hoher Grad an Parallelisierung zu erreichen.

Es hat sich überraschend gezeigt, daß die erfindungsgemäßen Doppelstrang-  
30 Nukleinsäure-Sonden die Möglichkeit bieten mit Nukleinsäure-Doppelsträngen interagierende Faktoren über eine Änderung der Leitfähigkeit zu detektieren. Interagierende Faktoren sind chemische Substanzen oder Strahlungen, die mit einem Nukleinsäuredoppelstrang in Wechselwirkung treten und eine Änderung in der Primär-, Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur des Doppelstranges auslösen.

## 9

Diese strukturellen Änderungen führen zu einer signifikanten Änderung des elektrischen Widerstandes der Duplexstruktur und damit zu einer Änderung des Elektronenflusses entlang der doppelsträngigen Nukleinsäure. Vermutlich haben neben den strukturellen Änderungen der doppelsträngigen Nukleinsäuren durch 5 interagierende Faktoren weitere Effekte wie z. B. die isolierende Wirkung von an Nukleinsäuren gebundenen Proteinen oder Peptiden oder die direkte Teilnahme von interkalierenden Substanzen, wie z. B aromatischen Molekülen, an der Elektronenleitung durch den Nukleinsäuredoppelstrang ebenfalls einen Einfluß auf 10 den resultierenden Elektronenfluß. In der Regel erfolgt zwischen den Sonden und den interagierenden Substanzen eine Aggregatbildung, wobei die Aggregate über zwischenmolekulare Kräfte oder sogar über kovalente Bindungen stabilisiert werden.

Änderungen in der elektrischen Leitfähigkeit von doppelsträngigen Nukleinsäuren werden z. B. durch die Bindung von Proteinen oder Peptiden, wie Antikörpern, 15 Polymerasen, Transkriptionsfaktoren, Enhancern oder Repressoren, deren Aktivität wiederum durch mittelbar wirkende Substanzen wie z. B. über Induktoren oder modifizierend wirkende Enzyme, moduliert werden kann, hervorgerufen. Organische Moleküle wie einige Hormone können ebenfalls direkt oder in Verbindung mit Proteinen oder Peptiden, wie z. B. Hormonrezeptoren, mit doppelsträngigen 20 Nukleinsäuren interagieren. Einzelsträngige Nukleinsäure kann ebenfalls z. B. unter Triplexbildung mit doppelsträngigen Nukleinsäuren interagieren. Aber auch salzhaltige Lösungen, Mimetika oder in die Nukleinsäure-Duplex interkalierende Substanzen, darunter Cytostatika wie die Anthracycline rufen meßbare Änderungen 25 in der Struktur des Doppelstranges hervor.

25 Die bisher beschriebenen Effekte lassen die kovalenten Bindungen im Doppelstrang intakt. Andere Proteine oder Nukleinsäure schädigenden Substanzen greifen direkt die Primärstruktur der Nukleinsäuren an. Endonukleasen spalten Nukleinsäuren, Exonukleasen bauen Nukleinsäuren von einem freien Strangende her ab, Ligasen 30 knüpfen kovalente Bindungen zwischen endständigen Nukleotiden, während Topoisomerasen Einzelstrangbrüche und -verknüpfungen hervorrufen. Aber auch Mimetika, Nukleinsäure schädigende Substanzen und Cytostatika, die z. B. auf Nukleinsäuren alkylierend oder quervernetzend wirken, wie Platin-Komplexe, z. B. Cisplatin, Methansulfonate, z. B. Busulfan, oder n-Nitroso-Verbindungen, z.B.

## 10

Carmustin können deren kovalente Bindungen angreifen und/oder neue kovalente Bindungen knüpfen. Radioaktive und elektromagnetische Strahlung, wie z. B.  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder UV-Strahlung, kann ebenfalls zu solchen strukturellen Änderungen und damit zu einer meßbaren Änderung des Elektronenflusses innerhalb der doppelsträngigen Nukleinsäure führen.

5 Nukleinsäure

Die Verwendung der erfindungsgemäßen doppelsträngigen Nukleinsäurederivate als Sonden bietet vielfältige Vorteile. Alle Wechselwirkungen denen eine Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonde ausgesetzt ist und die einen Effekt auf die elektrische

10 Leitfähigkeit haben sind detektierbar. Die Messung kann coulombmetrisch, impedometrisch, bevorzugt frequenzabhängig resistiv oder kapazitiv, voltammetrisch, potentiometrisch oder amperometrisch erfolgen.

Der störende Effekt von an der Elektrode unmittelbar entladenen Ionen aus der Reaktionslösung ist überraschender weise sehr gering. Um die Meßempfindlichkeit

15 weiter zu steigern kann der Elektronenfluß durch die doppelsträngige Nukleinsäure-Sonde frequenzmoduliert werden. Die Modulation kann bei Verwendung von photoinduzierbaren Elektronen-Donor-Einheiten über Lichtblitze erfolgen. Über die Anzahl der aufgebrachten Sonden oder über die Verlängerung der Meßdauer können auch sehr geringe Leitfähigkeitsänderungen detektiert werden. Bevorzugt

20 wird die Anzahl der Sonden so gewählt, daß die durch die Interaktion zwischen der doppelsträngigen Nukleinsäure und der mit ihr wechselwirkenden Faktoren resultierende Stromänderung mindestens im nA-Bereich liegt.

Aufgrund der besonders hohen Sensitivität haben sich als besonders geeignete Meßmethode die Cyclovoltammetrie, Differenz-Puls-Voltammetrie und Square-Wave-Voltammetrie erwiesen.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Sonden liegt in der hohen Kompatibilität mit den unterschiedlichsten Reaktionsmedien. Insbesondere die Verwendung von Rohextrakten als Reaktionsmedium oder die Verwendung von Reaktionsmedien mit

30 einer den natürlichen Bedingungen entsprechenden Salzkonzentration sind von Interesse. Weiterhin kann die Kinetik von Doppelstrang-Nukleinsäure Wechselwirkungen untersucht und Gleichgewichtskonstanten von doppelsträngigen Nukleinsäuren mit interagierenden Substanzen bestimmt werden. Das bietet die

## 11

Möglichkeit Antagonisten und allosterische Wechselwirkungen mit anderen Faktoren aufzufinden und deren Aktivität zu bestimmen. Es können dabei Untersuchungen als Mehrschritt-Reaktion durchgeführt werden, bei denen einzelne Faktoren während des Meßvorganges nacheinander zu der Reaktionslösung pipettiert werden.

5

Weitere Erfindungsgegenstände sind Verfahren zur Detektion von Wechselwirkungen zwischen doppelsträngigen Nukleinsäuren und mit ihnen interagierenden Faktoren und die Verwendung der erfindungsgemäßen Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden dafür.

10

Besonders geeignet sind die erfindungsgemäßen Sonden für die Untersuchung der Genregulation, insbesondere der Transkription oder Repression von Genen. Bei der Genregulation spielen eine Vielzahl von Substanzen die unmittelbar mit der doppelsträngigen DNA interagieren, wie RNA-Polymerasen, Transkriptionsfaktoren,

15

Repressoren oder Enhancer oder die nur mittelbare Wirkung entfalten, wie z. B. Induktoren, Enzyme, wie Phosphorylasen, second messenger, wie cAMP oder cGMP, Rezeptoren und deren Bindungspartner, wie Hormone eine wichtige Rolle. Die Signalketten, die zu einer Transkription oder Repression einzelner Gene führen können dabei äußerst komplex sein. Die erfindungsgemäßen Sonden können bei

20

der Aufklärung des Zusammenspiels der einzelnen Faktoren wichtige Erkenntnisse liefern.

Dazu werden z. B. bekannte regulatorische DNA-Sequenzen eines Gens in die Sonden eingebaut. Die Sonden sind auf einer Elektrodenoberfläche aufgebracht, so

25

dass die Summe der Änderung der elektrischen Leitfähigkeit der Doppelstrang-DNA-Sonden gemessen wird. Im freien, nicht assoziierten Zustand wird der Referenzelektronenfluß durch die Sonden in Gegenwart einer Referenzlösung ermittelt. Alternativ kann der Referenzwert auch über eine elektrochemische Standardzelle/Elektrode bestimmt werden. Die Referenzlösung enthält idealerweise

30

alle Komponenten der Reaktionslösung außer den zu testenden Faktoren. Durch das sukzessive Zusetzen der einzelnen zu testenden Substanzen wird der Referenzelektronenfluß moduliert. Die Änderung des Elektronenflusses gibt dann Auskunft über eine erfolgte Wechselwirkung zwischen der Testsubstanz und der Sondensequenz, die Stärke der Änderung des Elektronenflusses gibt Auskunft über

12.

die Stärke der Wechselwirkung und über die Gleichgewichtskonstante der Bindungsreaktion. So sind alle unmittelbaren Wechselwirkungen der DNA mit den direkt interagierenden Substanzen, wie Polymerasen, Transkriptionsfaktoren oder Repressoren meßbar. Eine Identifikation direkt mit der DNA-Duplex interagierender

5 Substanzen ist damit möglich. Folglich wird auch eine neue Möglichkeit zum schnellen Auffinden von Transkriptionsfaktoren mit gewebespezifischer Aktivität über die Verwendung von Sonden die bekannte gewebespezifische Promotorsequenzen enthalten eröffnet.

10 Der Effekt von weiteren, die Aktivität dieser Substanzen beeinflussenden, also mittelbar wirkenden Faktoren, kann über die Änderung der Gleichgewichtskonstanten von RNA-Polymerasen, Transkriptionsfaktoren oder Repressoren indirekt ermittelt werden. Dazu können entweder unterschiedliche Faktoren enthaltende Reaktionslösungen getestet werden oder die indirekt wirkenden Faktoren werden zu

15 der Reaktionslösung sukzessive eingebracht. Dadurch werden auch Wechselwirkungen zwischen einzelnen Substanzen innerhalb der regulatorisch wirkenden Signalketten ermittelbar.

Wird beispielsweise zu einem Operator-Repressor Komplex ein auf den Repressor

20 wirkender starker Induktor zur Reaktionslösung zugesetzt, geht die Gleichgewichtskonstante gegen Null und der gemessene Elektronenfluß gleicht sich dem Referenzelektronenfluß an.

Ein Beispiel für einen solchen Induktionsmechanismus bietet das Lactose-Operon

25 aus *Escherichia coli*. Die Wirkung des lac-Repressor wird durch die Anwesenheit von Lactose aufgehoben, der Repressor verliert seine Affinität zur Operatorsequenz und der Elektronenfluß wird sich dem Referenzwert angleichen. Wird zur Reaktionslösung  $\beta$ -Galactosidase, ein Lactose abbauendes Enzym gegeben, wird der lac-Repressor reaktiviert.

30 Ein weiteres Beispiel bildet der lexA-Repressor in *E. coli*, der zahlreiche Gene reguliert, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Durch Einzelstrang-DNA gebundene recA-Proteine wird lexA proteolytisch gespalten und damit vom

23

zugehörigen Operator abgelöst. Der Elektronenfluß innerhalb der Doppelstrang-DNA-Sonde wird sich folglich dem Referenzwert wieder angleichen.

Bei gegebener Induktorkonzentration ist der Grad der Angleichung des

5 Elektronenflusses an den Referenzelektronenfluß ein Maß für die Stärke der induktiven Wirkung. Durch die Variation der Induktorkonzentration können demgegenüber konzentrationsabhängige Effekte des Induktors auf den Repressor oder eine lineare Abhängigkeit der Induktion von der Induktorkonzentration, ermittelt werden.

10

Ist im Reaktionsansatz der Repressor inaktiv bleibt der Elektronenfluß auf dem Referenzwert. Durch Zusatz von weiteren Substanzen kann deren repressions-aktivierende Wirkung auf den Repressor getestet werden. Ein solcher Regulationsmechanismus liegt z. B. im Tryptophan-Operon von *E. coli* vor. Der trp-

15 Repressor wird durch die Gegenwart von Tryptophan aktiviert und der Repressor-Tryptophan-Komplex bindet an die zugehörige Operatorsequenz. Eine Abweichung des Elektronenflusses innerhalb der Doppelstrang-DNA-Sonden vom Referenzwert ist feststellbar.

20 Analog besteht die Möglichkeit die Gleichgewichtskonstante der Bindung von RNA-Polymerasen oder Transkriptionsfaktoren an DNA-Promotoren und die Wirkung von deren Cofaktoren und deren Modifikationen zu bestimmen. Dazu können Sonden verwendet werden die eine Promotorsequenz beinhalten. Es kann dann ein Referenzwert bestimmt werden der durch die Zugabe von einzelnen Faktoren moduliert wird. Eine Änderung des Referenzwertes zeigt eine Wechselwirkung der zugesetzten Substanz an. Darüber kann dann die Identifikation der im Promotorbereich bindenden RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren erfolgen.

Verwendet man z. B. den SV 40 Promotor zur Herstellung der Doppelstrang-

30 Nukleinsäure-Sonden kann die Bindung des spezifisch an diesen Promotor bindenden Transkriptionsfaktors Sp1 ermittelt werden.

Durch Zusatz weiterer Protein- oder Peptid-Cofaktoren, second messenger oder modifizierend wirkender Enzyme, wie z. B. Phosphorylasen, oder die Transkription

24

beeinflussender Moleküle, wie einige Antibiotika, wird deren aktivierender oder inhibierender Einfluß auf die Transkriptionsfaktor-DNA-Bindung meßbar.

Im Falle des Transkriptionsfaktors Sp1 wird z. B. dessen Bindung an den SV 40

5 Promotor durch das Antibiotikum Actinomycin D inhibiert.

Ein weiteres Beispiel bildet der Transkriptionsfaktor p53, das Genprodukt eines Tumorsuppressorgens. p53 kann durch die Zugabe einer Phosphorylase, unter Anwesenheit eines geeigneten Phosphat-Spenders, wie z. B. ATP, phosphoryliert

10 und damit aktiviert werden. Der Elektronenfluß ändert sich durch die Bindung des phosphorylierten p53 an die Sondensequenz stetig, bis zu einem konzentrations-abhängigen Sättigungswert. Aus der Steigung der Elektronenfluß-Zeit-Kurve können dann, neben dem reinen Wechselwirkungszusammenhang, Informationen über die Reaktionsgeschwindigkeit erhalten werden. Je größer die Steigung der Kurve ist  
15 desto höher ist die Reaktionsgeschwindigkeit, im Beispieldfall der Phosphorylierungsreaktion.

Falls die DNA-Sequenz der Sonden den Operator und den Promotor umfassen, können auch kompetitive Effekte zwischen RNA-Polymerasen, promotorbindenden

20 Transkriptionsfaktoren und Repressoren gemessen werden. Verdrängt z. B. ein Repressor einen bereits gebundenen Transkriptionsfaktor ändert sich der Elektronenfluß entsprechend. Die gemessenen Elektronenflüsse liegen zwischen den Werten für die nur eine RNA-Polymerase und/oder den Transkriptionsfaktor und nur den Repressor enthaltenden Reaktionslösungen. So kann z. B. der unmittelbare  
25 Einfluß des lac-, trp- oder lexA-Repressors auf die RNA-Polymerasen-Bindung an den Promotor untersucht werden.

Ein besonderer Vorteil des hier beschriebenen Verfahrens ist die Möglichkeit zur Untersuchung von allel spezifischen Wechselwirkungen zwischen regulatorisch

30 aktiven Substanzen und den zugehörigen DNA-Regulationssequenzen. So kann die unterschiedliche Aktivität von DNA-Sequenzen und DNA bindenden Proteinen oder Peptiden des Wildtyps und mutierten DNA-Sequenzen, Proteinen oder Peptiden in getrennten Ansätzen unabhängig von phänotypisch erkennbaren Veränderungen

15

untersucht werden. Insbesondere die Untersuchung von rezessiv ausgeprägten Merkmalen wird möglich.

Darüber hinaus können Genproduktmischungen unterschiedlicher Allele eines Gens,

5 die unmittelbar oder mittelbar mit doppelsträngiger DNA wechselwirken untersucht werden. Bindet z. B. ein Wildtyp-Transkriptionsfaktor an einen Promotor und nicht an dessen Mutante ergibt ein Extrakt eines Transkriptionsfaktors aus einem homozygoten Wildtyp-Organismus die größte Elektronenflußänderung durch die Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonde, ein Transkriptionsfaktorextrakt aus einem 10 homozygot Mutanten-Organismus ergibt keine Änderung der Leitfähigkeit der Sonde. Heterozygote Organismen bezüglich des Transkriptionsfaktors ergeben eine Elektronenfluß durch die Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonde die zwischen den beiden Extrakten aus den homozygoten Organismen liegt, in diesem Fall müssen Extrakte mit bestimmter Konzentration eingesetzt werden.

15

Das Verfahren ist nicht auf die Identifikation von Substanzen, die an der Genregulation teilhaben beschränkt, so können z. B. auch Histone, Helicasen, Topoisomerasen oder Ligasen an doppelsträngige DNA binden. Während Helicasen, Topoisomerasen und Chromatin-remodulierende Enzyme (z. B. Nukleosomale

20 ATPase ISWI) den Elektronenfluß durch die Sonden in der Regel mindern kann, wenn Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden eingesetzt werden, die ein oder mehrere Bindungsbrüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat enthalten, die ligiert werden, auch zu einer Elektronenflußerhöhung führen.

25 Der Verlust der Leitfähigkeit wird bei Nukleasen beobachtet, die Doppelstrangstrukturen erkennen und abbauen. Der Elektronenfluß durch die Sonden fällt stetig und geht, bei genügend langer Reaktionsdauer gegen null. Durch Zugabe von Nukleasen blockierenden Stoffen ist ein solcher Effekt nicht zu beobachten.

30 Mit Hilfe gebundener RNA-DNA-Hybrid-Sonden besteht die Möglichkeit z. B. RNAsen zu untersuchen, die RNA-Teile innerhalb eines Doppelstranges erkennen und abbauen. Der Verlust der RNA-Bausteine generiert einen verbleibenden Einzelstrang, der nun durch den Verlust der Leitfähigkeit nachweisbar ist. Dazu muß nicht die gesamte RNA abgebaut werden, schon der Verlust von ein bis zwei

Ribonukleotiden zwischen den Elektronen-Donor-Einheiten bzw. Elektronen-Akzeptor-Einheiten und der Elektrode hat ein drastisches Absinken der Leitfähigkeit im Doppelstrang zur Folge. Analog können mit DNA-Doppelstrang Sonden DNAsen nachgewiesen werden.

5

Den signifikantesten Effekt auf die Leitfähigkeit von Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden haben Restriktionsenzyme, wie z. B. Hind III das einen glatten

Doppelstrangbruch katalysiert oder EcoR I oder PST I das einen versetzten Doppelstrangbruch erzeugt, sofern eine geeignete Restriktionsstelle in der

10 Doppelstrangsequenz vorhanden ist. Durch das Zertrennen beider Nukleinsäurestränge zwischen den Elektronen-Donor-Einheiten bzw. Elektronen-Akzeptor-Einheiten und der Elektrode kommt der Elektronenfluß durch den Doppelstrang vollständig zum erliegen.

15 Mit Hilfe der erfindungsgemäßigen Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden können auch die Bindungssequenzen einzelner Nukleinsäure bindender Substanzen ermittelt werden. Dazu nutzt man vorteilhafter weise Elektroden-Arrays, bei denen jedes Feld mit einer Gruppe von Doppelstrang-Nukleinsäuren genau definierter Sequenz verbunden sind. Im Idealfall sind alle möglichen  $4^n$  Sequenzen, wobei n die Anzahl 20 der Basenpaare ist, auf der Elektrode in  $4^n$  getrennt elektronisch auslesbaren Feldern aufgebracht. Doppelsträngige Nukleinsäuren bindende Faktoren modulieren die Leitfähigkeit der Arraypositionen, die eine Sequenz enthalten, die von dem Faktor erkannt wird. Über die entsprechenden Arrayposition ist die zugehörige erkannte Sequenz bestimmt. Mit Hilfe der gewonnenen Sequenzen können Sonden 25 hergestellt werden, mit denen wiederum über herkömmliche Hybridisierungsmethoden die zugehörigen Gene identifiziert werden können. Mit dieser Methode können aber auch durch ortsspezifische Mutagenese hergestellte modifizierte Nukleinsäuresequenzen oder Transkriptionsfaktoren bewertet werden. Eine starke Nukleinsäure-Transkriptionsfaktor/RNA-Polymerase-30 Bindung ist ein Indiz für einen hoch aktiven transkriptionsfördernden Komplex. Die Selektion von hoch aktiven Promotorsequenzen und den zugehörigen hoch aktiven Transkriptionsfaktoren ist somit möglich. Solche Promotor/Transkriptionsfaktor-Komplexe können zur Konstruktion neuartiger Expressionsvektoren verwendet werden.

27

Es können auch Extrakte von regulatorisch wirkenden DNA-Fragmenten nicht genau spezifizierter Sequenzen eines bestimmten Gens in die doppelsträngigen Nukleinsäure-Sonden eingebaut werden. Mit bekannten an diese Sequenzen

5 bindende Faktoren bestimmter Konzentration kann dann festgestellt werden, ob homozygot bindende Sequenzen, homozygot nicht bindende Sequenzen oder heterozygote Sequenzmischungen in den Sonden vorliegen.

Alternativ kann ein Nukleinsäurefragment-Extrakt direkt zu einem Doppelstrang-

10 Nukleinsäure-Sonden / sondenbindendes Protein zugesetzt werden. Gemessen wird dann die kompetitive Wirkung des Nukleinsäurefragment-Extraktes auf das Meßsystem.

Neben den bisher erwähnten doppelsträngige Nukleinsäure erkennenden

15 Substanzklassen können auch einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäuren mit den Sonden-Sequenzen interagieren.

Die zumindest teilweise Trennung des Nukleinsäure Doppelstranges der Sonde aufgrund der Hybrisierung der als Bindungspartner konkurrierenden einzelsträngigen

20 Nukleinsäuren mit einer komplementären Sondensequenz führt zu Triplexstrukturen oder zu einer Auflösung der Sonden-Duplex durch Umhybridisierung. Die Leitfähigkeit der Sonde wird damit unterbrochen bzw. geändert. Mit dieser Methode können folglich Hybridisierungereignisse detektiert werden.

Wird in der Sonde eine destabilisierte Doppelstrang-Nukleinsäure-Sequenz verwendet wird die Hybridisierung mit einer in Lösung befindlichen einzelsträngigen Nukleinsäure erleichtert. Eine Destabilisierung gegenüber einem DNA-Doppelstrang kann z. B. durch den Einsatz von DNA/RNA-Hybridien erreicht werden. Die DNA/RNA-Hybrid-Paarung kann zusätzlich durch eine Modifizierung des DNA-Stranges zur Phosphorthioat-Nukleinsäure geschwächt werden.

30 Die erleichterte Hybridisierung mit einem in Lösung befindlichen Einzelstrang kann ebenfalls durch ein aus der Doppelstrang-Sonde überhängendes Einzelstrangende erreicht werden. Die Hybridisierung findet dann mit dem Einzelstrangende und Teilen der Doppelstrangstruktur statt. Ist in der erkannten Doppelstrangstruktur ein

28

Bruch im Nukleinsäure-Rückgrat eingeführt dann kann sich das neugebildete Hybrid von der Sonde sogar vollständig lösen und den Elektronenfluß innerhalb der Sonden unterbrechen.

- 5 Darüber hinaus können auch Rekombinationseignisse detektiert und an der Rekombination beteiligte Faktoren, insbesondere Enzyme identifiziert werden. Bei der vollständigen Rekombination einer doppelsträngigen Nukleinsäure mit der Sondensequenz können die Elektronen-Donor- bzw. Elektronen-Akzeptor-Einheiten von der Elektrode getrennt werden. Es kann kein Elektronenfluß mehr durch die
- 10 Sonde stattfinden. Das Rekombinationseignis muß allerdings nicht vollständig abgeschlossen sein, die Bildung einer Triplexstruktur, die die Doppelstrang-Sondenstruktur beeinflußt reicht aus, um ein Verringerung der elektrischen Leitfähigkeit zu messen. Setzt man der Reaktionslösung rekombinationsfördernde Faktoren, wie z. B. das recA-Protein aus *E. coli* zu, dann ist eine schnellere
- 15 Elektronenflußabnahme bzw. erhöhte Gesamtelektronenflußabnahme meßbar.

Enthalten die Sonden Integrationsstellen für transponierbare Elemente können auch Transpositionseignisse bestimmt werden. Da die Stärke des Elektronenflusses im Doppelstrang der Sonde mit steigendem Abstand, also steigender Zahl der

- 20 Basenpaare, zwischen der Elektronen-Donor-Einheit bzw. Elektronen-Akzeptor-Einheit und der Elektrode abnimmt, nimmt auch der Elektronenfluß bei Integration eines Transposons in die Sondensequenz ab. Beim Ablauf der Rückreaktion ist eine entsprechende Zunahme des Elektronenflusses nachweisbar.
- 25 Die Verwendung der Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden ist auch zum Nachweis von Nukleinsäure schädigenden Substanzen bzw. zum Nachweis der Nukleinsäure schädigenden Wirkung von chemischen Substanzen geeignet. Die Schädigung einer doppelsträngigen Nukleinsäure kann auf unterschiedliche Weise hervorgerufen werden. So können einige Substanzen, vor allem aromatische Stoffe wie
- 30 Ethidiumbromid oder Acridin in die Nukleinsäure-Duplex-Struktur interkalieren. Andere Substanzen können mit Nukleinsäuren reagieren, so z. B. starke Basen, die die Nukleinsäuren Hydrolysieren, Benzpyrine, die sich an die Nukleinsäuren addieren oder Peroxide, die leicht Radikale bilden und radikalische Kettenreaktionen innerhalb der Nukleinsäure auslösen. Die Veränderung der Nukleinsäurestruktur

19

durch diese Substanzen bewirkt eine Änderung der Leitfähigkeit der Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden.

Ein solcher Test kann in einem kompartimentierten Reaktionsgefäß durchgeführt

5 werden bei dem die Bodenfläche durch die Elektrode in Array-Form gebildet wird.

Die Sonden sind in gleichmäßiger Dichte auf den einzelnen Arraypositionen  
aufgebracht. Jedes Reaktionskompartiment kann mit einer, eine andere

Testsubstanz enthaltende Reaktionslösung versetzt werden. Es können auch  
Reaktionslösungen angesetzt werden, die dieselbe Testsubstanz in

10 unterschiedlichen Konzentrationen enthalten. So kann ein einfacher Test zur  
Identifikation DNA schädigender und damit karzinogen wirkender Substanzen  
geschaffen werden.

Doppelsträngige Nukleinsäuren stehen auch in Wechselwirkung mit im

15 Reaktionsmedium gelösten Stoffen, insbesondere mit destabilisierend wirkenden  
ionischen Verbindungen. Aber auch Wechselwirkungen mit dem Lösemittel selbst  
können die Leitfähigkeit der Sonden beeinflussen. So geht zum Beispiel bei der  
Dehydratisierung der DNA-Doppelhelix des B-Typs in den A-Typ über. Dieser  
Übergang kann mit Hilfe der neuartigen Sonden gemessen werden.

20 Die Reaktionsmedien oder –lösungen können beliebige Lösemittel und Zusatzstoffe  
enthalten. Bevorzugt werden als Reaktionslösungen wäßrig, ionische  
Pufferlösungen, die mit doppelsträngigen Nukleinsäuren interagierende chemische  
Substanzen enthalten können eingesetzt. Der direkte Einsatz von Rohextrakten als  
25 Reaktionsmedium ist ebenfalls möglich. Die Detektion der Wechselwirkung zwischen  
den doppelsträngigen Nukleinsäure-Sondensequenzen und den damit  
interagierenden Substanzen findet bevorzugt unter physiologischen Bedingungen  
also in 10 bis 200 mM wässrigen, salzhaltigen Lösungen bei pH 7-9 statt. Als Puffer  
wird bevorzugt ein Phosphat-Puffer eingesetzt. Die Meßtemperatur liegt bevorzugt  
30 zwischen 4 und 40°C. Eine Abweichung von diesen Meßbedingungen kann  
allerdings im Einzelfall angebracht sein. Z. B. kann eine erhöhte Meßtemperatur  
zum Auffinden von Proteinen mit temperaturstabilen Aktivität, wie der für die PCR  
eingesetzte Taq-Polymerase, dienen.

20

Daraus ergibt sich eine vielfältige Einsetzbarkeit der Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden zur Analyse aktiver mit Nukleinsäure interagierender Faktoren bzw. aktiver doppelsträngiger Nukleinsäuresequenzen.

5 Die erfindungsgemäßen Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden können in analytischen Vorrichtungen mit klassischen Trennverfahren, wie z. B. der Chromatographie kombiniert werden. Über eine Auftrennung von Zellextrakten oder Substanz-Bibliotheken können schnell aktive an eine doppelsträngige Nukleinsäure bindenden Bestandteile aufgespürt werden. Der Vorgang kann kontinuierlich in einem „online“-  
10 Meßverfahren betrieben werden.

Im folgenden werden zur Verdeutlichung der Erfindung exemplarisch mögliche Herstellungsverfahren der erfindungsgemäßen Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden und einzelne Verfahren zur Messung von Interaktionen zwischen

15 Doppelstrangnukleinsäure und mit ihnen wechselwirkenden Faktoren beschrieben.

Die Herstellung geeigneter Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden kann über dem Fachmann bekannte Verfahren erfolgen. Dazu wird in die Nukleotidsequenzen, die in die Sonde eingebaut werden sollen, zur Anbindung an eine Goldelektrode

20 Thiolgruppen und zur Anbindung der Elektronen-Donor-Einheiten Aminogruppen eingebracht.

Die eingesetzten Oligonukleotide können, sofern nicht käuflich erhältlich, z. B. mit einer DNA-Synthesemethode, der sogenannten Phosphoramiditmethode dargestellt

25 werden (Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside phosphoramidites. A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* (1981), 22(20), 1859-62).

Es handelt sich hier um eine Methode, mit der sowohl unmodifizierte als auch modifizierte Nukleinsäuren, z.B RNA's Phosphorthioate und PNAs in hoher Reinheit

30 und Ausbeute gezielt dargestellt werden können und heute routinemäßig zum Einsatz kommt.

Zur Synthese werden die gewünschten Synthesebausteine im 1 µmol Maßstab in einer vorgegebenen Reihenfolge auf festem CPG-Trägermaterial mit Hilfe eines

21

Expedite Synthesizer vom Typ Expedite 8909 der Firma PerSeptive Biosystems aufgebaut. Dazu werden die 0.1 M Lösungen von entsprechenden Phosphoramiditbausteinen und 0.5 M Tetrazol-Lösung verwendet. Die Bausteine werden aufgrund ihrer Empfindlichkeit in trockenem Acetonitril ( Wassergehalt < 30 5 ppm) gelöst.

Die notwendigen Modifizierungen werden mit Hilfe von Amino-, SH-bzw. Phosphat-On-Phosphoramidit-Bausteine (Eurogentec, Clontech) und Trägermaterialien („SH-CPG“-Chemgenes, Glen Research, 3'-Phosphate CPG Glen Research) aufgebaut.

10 Zur Einführung der Thiolmodifikation wird am 3' Ende des Oligonukleotides die gewünschte Sequenz auf Thiol-CPG-Trägermaterial (Chemgenes) im Maßstab 1 μMol aufgebaut. Zur Vermeidung der Aufoxidation des Schwefels wird während der DNA-Synthese eine 0,02M Iodlösung benutzt (Kumar, A. et al., Nucleic Acids Research 1991, 19, 4561).

15 Die Aminogruppe kann mit Hilfe einer 0.2 M Lösung AminoModifier II (Clontech) bzw. 0.1 M Lösung Amino-Modifier C6 dT (Glen Research) in trockenem Acetonitril (Wasser < 30 ppm) an ausgewählten Positionen, die sich nicht an der Elektrodenseite der Doppelstrang-Struktur befinden, gezielt eingeführt werden.

20 Die Aufarbeitung der modifizierten Oligonukleotide erfolgt nach Abschluß der Synthesen, dazu werden die Oligomere mit wässriger Ammoniaklösung-(25-32 %) basisch vom CPG-Träger abgespalten und über mehrere Stunden bei 55 °C inkubiert. Bei Anwesenheit von Thiolgruppen erfolgt Zugabe von DTT bis zu einer Konzentration von 50mM. Im Anschluß wird die Lösung eingeengt und vom Ammoniak befreit und mehrfach mit Wasser koevaporiert. Oligonukleotide, die eine modifizierte Thymidinbaustein enthalten sollen werden werden länger gekuppelt. Nach Bestimmung der Absorption bei 260 nm werden die Rohprodukte mit Hilfe RP-HPLC (Lichrochart 100 RP-C18) von Abbruchprodukten und abgespalteten

25 Schutzgruppen befreit. Als mobile Phase wird ein Gradient von Acetonitril in 0.1 Triethylammoniumacetat-Puffer, von 0-60 % in 60 Minuten benutzt. Der Hauptpeak wird isoliert, spektrometrisch bei 260 nm quantifiziert und lyophilisiert und in 500 μl 50mM DTT gelöst. Die Lösung wird für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und im Anschluß mit Hilfe einer PD-10 Säule nach Herstellerangaben (Pharmacia) entsalzt

## 22

und zur kovalenten Anbindung an die Elektrode auf die Goldoberfläche pipettiert. Die eingesetzten Pufferlösungen werden zuvor mit Argon gesättigt.

Bei einem alternativen Verfahren zur Modifikation der Oligonukleotide mit einer

5 Thiolgruppe Auf einem 3'-Phosphate CPG werden, wie oben beschrieben die Sequenz mit Phosphoamidit-Nukleotid-Bausteine in der gewünschten Reihenfolge aufgebaut. Als Amino-modifizierter Baustein kann ein AminoModifier II (Clontech) verwendet werden.

Nach Abspaltung des Amino modifizierten 3'-phoshorylierten Oligonukleotides wird

10 zur Einführung der benötigten Thiolfunktion das Oligonukleotid mit (HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S)<sub>2</sub> zum P-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SS-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH verestert. Nach Veresterung des 3'-Endes des Oligonukleotide, wird die Nukleinsäure in einer Konzentration von 1-2x10<sup>-4</sup> M in Auftragspuffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5 mit Zusatz von 0.7 molarem TEATFB) mit 10<sup>-4</sup>-10<sup>-1</sup> molar 2-Hydroxymercaptoethanol auf die gereinigte

15 Elektroden-Goldoberfläche gegeben und für 2-24 Stunden inkubiert.

Zur Präparation der Elektroden-Goldoberfläche können z. B. frisch gespaltene Mica (Muskovit-Plättchen) in einer elektrischen Entladungskammer mit einem Argon-Ionenplasma gereinigt und anschließend durch elektrische Entladung Gold (99,99 %) in einer Schichtdicke von ca. 100 nm aufgebracht werden (Ron, Hannoch; Matlis, Sophie; Rubinstein, Israel. Self-Assembled Monolayers on Oxidized Metals. 2. Gold Surface Oxidative Pretreatment, Monolayer Properties, and Depression Formation. Langmuir (1998), 14(5), 1116-1121; Golan, Yuval; Margulis, Lev; Rubinstein, Israel. Vacuum-deposited gold films. I. Factors affecting the film morphology. Surf. Sci. (1992), 264(3), 312-26.)

Die Metalloberfläche wird dann mit einer 30 %H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 70 % igen-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung gereinigt und anschließend in Ethanol für 20 Minuten getaucht. Die Oberfläche wird mit bidest. Wasser ein letztes Mal gespült.

30 Die Präparation käuflicher Edelmetall-Elektroden kann alternativ durch Polieren der Elektrodenoberfläche und nachfolgendem Spülen durchgeführt werden. Die anschließende elektrochemische Reinigung der Elektroden kann z. B. cyclovoltammetrisch in Natronlauge mittels eines Potentiostat erfolgen, wobei die Elektroden mehrmals im Potentialbereich von -2,0 bis +1,2V gegen eine Ag/Ag -

23

Referenzelektrode (3M NaCl-Lösung). Als Gegenelektrode kann z. B. ein Platin-Stab dienen.

Die Anbindung SH-modifizierter Oligonukleotide erfolgt z. B. durch Inkubation der

5 gereinigten Au-Elektroden mit einer Lösung des entsprechenden Oligonukleotids in Phosphatpuffer durch Auftröpfen auf die Goldscheibe und mehrstündiger Inkubation in einer Wasser-gesättigten Atmosphäre.

Die Anbindung einer Elektronen-Donor- oder -Akzeptor-Einheit, wie z. B.

10 Pyrrolochinolinchinon, Methoxatin, PQQ oder Ferrocen kann an die monoschichtgebundenen oder in Lösung befindlichen Oligonukleotide erfolgen.

Die Anknüpfung der Redoxeinheiten (PQQ, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) an die primäre Aminogruppe des modifizierten T-Bausteins (Aminomodifier dT) im Hairpin

15 an monoschichtgebundenen Oligonukleotiden wird durch Aktivierung der PQQ-Carboxylatgruppen in Puffer mit einem löslichen Carbodiimid und anschließender Amidbildung erreicht.

Die zweite Methode, Redoxeinheiten enthaltende Oligonukleotidmonoschichten auf

20 Gold zu erhalten, ist die Modifizierung der Oligonukleotide mit redoxaktiven Elektronen-Donor- oder -Akzeptor-Einheiten, wie z. B. PQQ und Ferrocen-Essigsäure in Lösung und anschließender Immobilisierung auf der Goldoberfläche.

Die Anbindung einer Redoxeinheit erfolgt durch Aktivierung der Car-

25 boxylatfunktionen und deren anschließender Bindung an die primäre Aminogruppe des modifizierten T-Bausteins ( Amino-Modifier dT) im Oligonukleotid.

Hierzu wird PQQ in Wasser gelöst und mit N-Hydroxysuccinimid und wasserlöslichem Carbodiimids versetzt. Für die Modifizierung des Oligonukleotids wird die Aktivierungslösung mit Wasser und Triethylammoniumhydrogencarbonat-

30 Lösung versetzt. Nach Zugabe des amino-modifizierten Oligonukleotids wird die Lösung stehen gelassen. Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung kann durch Größenausschlußchromatographie erfolgen.

24

Die Synthese der Ferrocenessigsäure-modifizierten Oligonukleotide erfolgt durch Aktivierung der Ferrocenessigsäure (z. B. mit o-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU)) und anschließender Kupplung mit der freien Aminogruppe des Oligonukleotids. Die aktivierte Ferrocenessigsäure wird zu 5 einer Lösung des modifizierende Oligonukleotid in Anwesenheit einer Base gegeben. Nach einer Reaktionszeit von mehreren Stunden wird das Oligonukleotid aufgereinigt.

Die kovalente Anbindung einer Zn-Bakteriochlorophyll-Elektronen-Donor-Einheit 10 kann nach Anbindung der Nukleinsäure an die Elektroden-Goldoberfläche und einem weiteren Waschschritt mit Wasser erfolgen. Dazu wird das modifizierte Nukleinsäuresubstrat mit einer Lösung von  $3 \times 10^{-3}$  molarem Chinon 2-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H-UQ-50), 10<sup>-2</sup> molaren EDC (3'-Dimethylaminopropyl)-N-carbodiimid und 10<sup>-2</sup> molarem N-Hydroxysulfussuccinimid in 0.1 M HEPES-Puffer (2-(4-2-Hydroxyethyl)-1-15 piperazino)-ethansulfonäure, pH 7.5) benetzt. Das eingesetzt Chinon wird erhalten indem man standardmäßig eine Methoxygruppe durch HBr (Etherspaltung) spaltet, die entstehende freie Hydroxygruppe wird mit äquimolaren Menge Cl-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H umgesetzt und im Anschluß chromatographisch gereinigt (Moore; H. B. and Folkers, K., Journal of American Chemical Society, 1966, 88, 5919-23; Daves, G. et 20 al. Journal of American Chemical Society, 1968, 90, 4487-4493). Das modifizierte Substrat wird nach Waschung mit bidest. Wasser, erneut mit einer wässrigen Lösung aus  $3 \times 10^{-3}$  molarem Zn-Bakteriochlorophyll (als freie Säure), 1,5x 10<sup>-1</sup> molarem (3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid, 2,5x10<sup>-3</sup> molarem Hydrazin-Monohydrat und 1x10<sup>-1</sup> molarem Imidazol für 16 Stunden bei 23 °C inkubiert. Das 25 Zn-Bakteriochlorophyll als freie Säure wird durch Inkubation mit Trifluoressigsäure hergestellt.  
(Hartwich, Gerhard; Fiedor, Leszek; Simonin, Ingrid; Cmiel, Edmund; Schaefer, Wolfgang; Noy, Dror; Scherz, Avigdor; Scheer, Hugo. Metal-Substituted Bacteriochlorophylls. 1. Preparation and Influence of Metal and Coordination on 30 Spectra. J. Am. Chem. Soc. (1998), 120(15), 3675-3683).

Die Hybridisierung oder Rückfaltung der Nukleinsäuren zu den doppelsträngigen Sonden kann vor oder nach Aufbringung der modifizierten Nukleinsäure auf der Elektroden-Goldoberfläche erfolgen. Die Hybridisierung kann z. B. gemäß dem

25

Fachmann bekannten Verfahren in gepufferter Lösung erfolgen. Bevorzugt werden bei der Herstellung der Sonden bereits hybridisierte Nukleinsäure-Duplexe verwendet. Die Hybridisierung erfolgt dabei unter kontrollierten Bedingungen unter langsamer Abkühlung, um Fehlpaarungen möglichst zu vermeiden. Bewährt hat sich 5 kurzzeitiges erhitzen auf 95°C und langsames abkühlen bis auf Raumtemperatur im Wasserbad.

Aufgebrachte einzelsträngige 5'-phosphorylierte (Phosphat-On-Phosphoramidit-Bausteine (Horn, T. and Urdea, M., Tetrahedron Letter, 1986, 27, 4705)) und zum

10 Thiol veresterte Nukleinsäuren, die nur einen kurzen Hairpin mit freiem 3`OH-Ende aufwiesen, können mit Hilfe einer DNA-Polymerase enzymatisch zu einem Doppelstrang aufgebaut werden. Dazu wird z. B. eine DNA Struktur mit einem Gemisch der vier Nukleotidtriphosphate mit Klenow Fragment der DNA I Polymerase inkubiert. Es werden die gewünschten Nukleinsäure-Duplexe erhalten.

15

Als vorteilhaft hat sich die Beschichtung, bevorzugt eine monomolekulare Beschichtung, der freien Elektrodenoberfläche erwiesen. Die Oberfläche einer Goldelektrode kann, z. B. mit Alkyldisulfiden, Alkylthiolen oder Hydroxyalkylthiolen nach Aufbringung der Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden gesättigt werden.

20

Im folgenden werden anhand der Figuren beispielhaft einzelne Assays beschrieben, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden durchgeführt werden können.

25 Fig. 1 beschreibt einen Assay zur Untersuchung von Restriktionsenzymen oder Exonukleasen.

Eine Doppelstrang-DNA-Struktur (11), mit einer Restriktionsschnittstelle und einer lichtinduzierbaren Elektronen-Donor-Einheit (12) wird, wie in den vorhergehenden 30 Beispielen beschrieben kovalent auf einer Goldelektrode (13) gebunden. Der DNA-Doppelstrang (11) der Sonde wird in einer Restriktionsenzyme z. B. *Pst*1 (14) enthaltenden Reaktionslösung in zwei Fragmente (17, 18) geschnitten. Die Aktivität wird über die Zeit unter Lichteinstrahlung (15) mit einer Auswertevorrichtung (16) gemessen.

26

In Umkehrung dazu kann durch Ligation von DNA-Zn-Bakteriochlorophyll-Abbauprodukte, z. B. aus der oben erzeugten Reaktionslösung, nachdem die Lösung über RP-HPLC präparativ vom Restriktionsenzym befreit wurde, wieder 5 enzymatisch verknüpft werden. Dazu kann das Fragment im Überschuß einer Ligase in einem DNA-Ligase-Puffer ligiert werden, die Effizienz wird durch die Erzeugung eines Elektronenflusses durch die aufgebaute doppelsträngige DNA amperometrisch detektiert.

10 In Fig. 2 wird ein Assay zur Untersuchung der Bindung eines Transkriptionsfaktor gezeigt.

Die Zugabe des Transkriptionsfaktors (21), z. B. Oct2A, TATA oder Sp1 erfolgt in 15 gepufferter Lösung auf eine Vorlage, bestehend aus einer Goldelektrode (22), die Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden (23) mit der jeweiligen, für den Transkriptionsfaktor spezifische Bindungstelle besitzt. Die Doppelstrang-DNA-Sondensequenzen (23) sind mit einer kovalent gebundenen lichtinduzierbare 20 Elektronen-Donor-Einheit (24), z. B. Zn-Bakteriochlorophyll, versehen. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Transkriptionsfaktor (21) erfolgt die Auslesung unter Lichteinstrahlung (25) mit einer Auswerteeinheit (26), parallel können zur Kontrolle Versuchsansätze analysiert werden, bei denen z. B. nicht an der 25 Elektrodenoberfläche gebundene Bindungsstellen des jeweiligen Transkriptionsfaktors enthaltende DNA-Fragmente (27) im Überschuß als Kompetitor mitgeführt werden.

In einem etwas abgewandelten Verfahren kann z. B. durch Zugabe des sp1 Kompetitors Actinomycin D vor und nach Zugabe von Sp1 die DNA-Protein Wechselwirkung und die hervorgerufene Änderung der Leitfähigkeit gemessen 30 werden.

Fig. 3 beschreibt einen Assay zum Nachweis einer DNA-DNA-Wechselwirkung.

27

Eine selbstkomplementäre DNA (31) mit einer kovalent gebundenen lichtinduzierbaren Elektronen-Donor-Einheit (34) wird auf der Goldelektrode (32) gemäß den oben aufgeführten Beispielen aufgebracht. Ein Bereich von Nukleotiden liegt konzeptionell bedingt am 3'-Ende als Einzelstrang vor. Durch Hybridisierung mit 5 einem längeren Oligomer, z. B. ein 38er-Oligomer (33), das über einen Bereich des anderen Nukleinsäurestranges eine Komplementarität aufweist, wird die Einzelstrangstruktur gezielt aufgefüllt. Dazu wird z. B. ein gepuffertes Oligomer (33) im Überschuß zu den gebundenen Sonden zugesetzt und das Gemisch wird dann inkubiert.

10 Der Überschuß an nichthybridisierten Oligonukleotiden wird im Anschluß ausgewaschen. Nach Zugabe einer zweiten komplementäre oligomere Einzelstrangnukleinsäuren enthaltenden gepufferten Lösung, dies kann im vorliegenden Fall z. B. ein zum Oligomer (33) komplementäres 38-Oligomer (35) sein, wird unter Lichteinstrahlung (36) die Umhybridisierung unter Ausbildung eines 15 Hybrids (37), gebildet aus den Oligomeren (33) und (35), mit Hilfe einer Auswerteeinheit (38) gemessen.

Fig. 4 beschreibt einen Assay zur Untersuchung der Interkalation von chemischen 20 Substanzen in doppelsträngige DNA.

In einem solchen Assay werden Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden (41) mit einer kovalent gebundenen lichtinduzierbaren Elektronen-Donor-Einheit (46) auf eine matrizenförmigen Goldelektroden-Array-Oberfläche (42) auf den einzelnen 25 Arraypositionen (47) aufgebracht. Die gebundenen DNA-Sonden (41) werden mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen der Substanzen A, z. B. Propidiumiodid (43), B, z. B. Ethidiumbromid (44) und C, z. B. Syber®green (45) inkubiert. (Die zweite Dimension der Arrayoberfläche wird in Fig. 4 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt). Nach Lichteinstrahlung (48) wird die Wirkung der 30 Substanzen A bis C (43) - (45) auf die Doppelstrang-Struktur über eine Auswerteeinheit (49) verfolgt. Die getrennt auslesbaren Arraypositionen liefern stoff- und konzentrationsabhängige Signale (50).

28

Die Figuren 5 bis 13 zeigen die mittels Differenz-Puls-Voltammetrie gemäß den folgenden Ausführungsbeispielen ermittelten Meßkurven.

5 Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1: Vorbehandlung der Goldelektroden

Die Reinigung der Au-Elektroden erfolgt durch Polieren der Elektrodenoberfläche mit

10 einer  $0,3\mu\text{m}$ -Tonerde-Suspension (LECO, St. Joseph, USA) und nachfolgendem Spülen mit Millipore-Wasser ( $10 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ). Die anschließende elektrochemische Reinigung der Elektroden erfolgt in  $0,2\text{M}$  NaOH mittels Cyclovoltammetrie (Potentiostat: EG&G PAR 273A, GB), wobei die Elektroden zuerst 5 mal zwischen Potentialen von  $-0,5$  und  $-1,8\text{V}$  (gegen Ag/AgCl-Referenzelektrode ( $3\text{M}$  NaCl)) und 15 anschließend 3 mal zwischen  $-0,8$  und  $1,0\text{V}$  (Vorschubgeschwindigkeit  $50 \text{ mV sec}^{-1}$ ) zyklisiert werden. Als Gegenelektrode dient ein Platin-Stab.

Beispiel 2: Methoden zur Modifizierung von Au-Elektroden mit redoxmarkierten

20 Oligonukleotiden

Zur Modifikation wurden Doppelstrangnukleinsäuren verwendet. Die Hybridisierung erfolgt in der Stammlösung ( $1\text{mmol/l}$  Lösung der selbstkomplementären

Einzelstrangnukleinsäuren in Wasser), die im Wasserbad auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und 25 innerhalb von 2 bis 4 Stunden langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurden.

Methode A: Modifizierung von Oligonukleotid-Monoschichten mit einem Redoxlabel

Anbindung von  $5'$ -SH-Oligos auf Gold

30 Die Anbindung der  $5'$ -SH-modifizierten Oligonukleotide (Interactiva, Ulm, D) (Sequenzen siehe Tabelle 1) erfolgt durch Inkubation der gereinigten Au-Elektroden mit einer  $100 \mu\text{M}$  Lösung des entsprechenden Oligonukleotids in  $1\text{M}$  Phosphatpuffer ( $\text{pH } 6,6$ , Calbiochem; Zusatz von  $0,5\text{mM}$  Dithiothreitol, (DTT, Sigma-Aldrich,

29

Steinheim, D) unterstützt die Anbindung von Ferrocen- modifizierten Oligonukleotiden) durch Auftröpfen von 5 µl dieser Lösung auf die Goldscheibe und 4-5 stündiger Inkubation bei 4°C in einer Wasser-gesättigten Atmosphäre.

Die Charakterisierung der so entstandenen Oligonukleotid-Monoschichten wird

5 durch die Blockierung der diffusionskontrollierten Fe(II/III)-Redoxreaktion in wässriger K<sub>3</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-Lösung (Salze von Merck, Darmstadt, D) (20 mM in 20 mM Phosphatpuffer pH 7) mittels Cyclischer Voltammetrie (CV) überprüft.

Verfüllen der Monoschicht-Lücken mit 1,6-Mercaptohexanol

10 Das Verfüllen der aus sterischen Gründen bedingten Lücken zwischen den einzelnen Oligonukleotid-Molekülen auf der Monoschicht geschieht durch Inkubation der Elektroden in einer 1 mM Lösung von 6-Mercaptohexanol (Aldrich, USA) in Millipore-Wasser (entgast) für 60-90 Minuten bei Raumtemperatur.

15 Anbindung eines Redoxlabels (Pyrrolochinolinchinon, Methoxatin, PQQ) an die monoschichtgebundenen Oligonukleotide

Die Anknüpfung des Redoxlabels (PQQ, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) an die primäre Aminogruppe des modifizierten T-Bausteins (Aminomodifier dT) im Hairpin

20 wird durch Aktivierung der PQQ-Carboxylatgruppen mit einem wasserlöslichen Carbodiimid (EDAC, Sigma-Aldrich) und anschließender Amidbildung erreicht. Diese Reaktion geschieht in einer PQQ-Lösung (ca. 1mg/ml in 10 mM HEPES-Puffer (pH 8) unter Zugabe von 50 mM EDAC für 30 – 60 Minuten bei Raumtemperatur.

25 Methode B: Synthese von redox-modifizierten Oligonukleotiden

Die zweite Methode, redoxgelabelte Oligonukleotidmonoschichten auf Gold zu erhalten, ist die Modifizierung der Oligonukleotide mit redoxaktiven Gruppen (PQQ und Ferrocen-Essigsäure) in Lösung und anschließender Immobilisierung auf der

30 Goldoberfläche.

Anbindung von PQQ:

## 30

Die Anknüpfung der PQQ-Redoxfunktionen erfolgt durch Aktivierung der Carboxylatfunktionen und deren anschließender Bindung an die primäre Aminogruppe des modifizierten T-Bausteins (Amino-Modifier dT) im Oligonukleotid.

Hierzu werden 1,65 mg PQQ (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in 25 µl Millipore-Wasser

- 5 (0,2M) gelöst und mit 1,15 mg N-Hydroxysuccinimid (NHS, 0,25M, Sigma-Aldrich) und 6 mg eines wasserlöslichen Carbodiimids, Ethyldiaminopropylcarbodiimid (EDAC, 0,5M) versetzt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wird der entstehende Niederschlag durch Zugabe von 50 µl DMF wieder gelöst. Nach weiteren 15 Minuten wird die Lösung mit weiteren 145 µl DMF verdünnt.

- 10 Für die Modifizierung des Oligonukleotids werden 120 µl der Aktivierungslösung mit 3,7 µl Millipore-Wasser und 3,2 µl Triethylammoniumhydogencarbonat-Lösung (TEK-Puffer, 1M, Fluka, Buchs, CH) versetzt. Nach Zugabe von 10 OD des amino-modifizierten Oligonukleotids wird die Lösung über 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung erfolgt durch

- 15 Größenausschlußchromatographie über eine Sephadex G25 M-Säule (Amersham-Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden).

Die Ausbeuten an Oligonukleotid liegen dabei in der Regel zwischen 70 und 90 %.

Die Synthese der Ferrocenessigsäure-gelabelten Oligonukleotide erfolgt durch Aktivierung der Ferrocenessigsäure mit TBTU (Fluka) und anschließender Kupplung

- 20 mit der freien Aminogruppe des Oligonukleotids. Hierzu werden im ersten Schritt 4,9 µg der Ferrocenessigsäure (Strem Chemicals, Kehl, D) in 100 µl DMF gelöst.

75 µl dieser Lösung werden dann zu einer Lösung von 6 mg TBTU in 75 µl DMF gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur aktiviert. 10 OD des zu

modifizierenden Oligonukleotids (als 1 mM wäßrige Lösung) werden mit 3,2 µl TEK-Puffer versetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 25 µl der aktivierten Ferrocenessigsäure und 95 µl DMF. Nach einer Reaktionszeit von 20 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur wird das Oligonukleotid wie oben beschrieben aufgereinigt.

Die Modifizierung der Elektroden mit den redoxgelabelten Oligonukleotiden erfolgt

- 30 entsprechend der Vorschrift für die unmodifizierten 5'-Thiol-aminomodifizierten Oligonukleotide.

## 31

Die elektrochemische Charakterisierung der redox-modifizierten Oligonukleotid-Monoschichten erfolgt mittels Cyclovoltammetrie (CV) und Differenz-Puls-Voltammetrie (DPV) in 20 mM Phosphatpuffer pH 7. Im Falle von an einer

5 Goldelektrode gebundenen PQQ modifizierten Nukleinsäureoligomeren tritt ein Signal der reversiblen Redoxreaktion bei einem Potential von ca. -100 mV (gegen Ag/AgCl) auf. Dies zeigt, daß die PQQ-Redoxeinheiten kovalent über die Nukleinsäureoligomere auf der modifizierten Elektrode gebunden sind. Die Redoxsignale für Ferrocenessigsäure- modifizierte Oligonukleotid-Monoschichten

10 treten bei Potentialen von ca. +200 mV (gegen Ag/AgCl) auf und sind in der Regel breiter und weniger intensiv als die entsprechenden PQQ-Signale.

## Beispiel 4:Experimente mit Intercalatoren:

15 Inkubation von PQQ-Oligoelektroden (hergestellt nach Beispiel 2 Methode A) in Intercalator-Lösungen:  
Die Inkubation wurde für eine PQQ-Zi6-Oligonukleotidelektrode **Seq.ID No. 4** (Tabelle 1) in Intercalator-Lösung (10 µM Hoechst 33258 (Bisbenzimid) (Fluka) in 1M Phosphatpuffer (pH 6.6) für 20 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Kurve (**51**) in Fig. 5 zeigt das DPV-Meßergebnis einer Zi6-PQQ-Elektrode in 20 mM Phosphatpuffer bei pH6.6, (reduktiver Scan, 10 mV/s, Schrittweite 500 ms, Pulsweite 20 ms, Pulshöhe 25 mV) vor der Inkubation mit Hoechst 33258  
25 Kurve (**52**) zeigt das DPV-Meßergebnis nach Inkubation in 10µM Hoechst 33258 in 1M Phosphatpuffer für 20 min bei RT.

Der elektrochemische Vergleich der Elektrode zeigt eine deutliche Abnahme des PQQ-Oxidationssignals auf maximal 20 % (Verhältnis der Peakhöhen) des Ausgangswertes nach Inkubation in der Intercalatorlösung (Fig. 5). Die Struktur des Oligonukleotids wird durch Intercalatoren folglich in einer Weise verändert, daß der Elektronentransfer stark gehemmt wird.

32

**Beispiel 5: Experimente mit DNase I:**

Die Inkubation einer PQQ-modifizierten Oligonukleotid-Elektrode (nach Beispiel 2, Methode A hergestellt) in einer DNase I-Lösung (2U in 100 µl 1x T7-Transkriptions-Puffer, als Kit von Promega, Madison, USA) für 15 (Fig. 6 Kurve (62)), bzw. 30 Minuten (Fig. 6 Kurve (63)) bei 37 °C ergibt bei anschließender elektrochemischer Charakterisierung mit CV und DPV eine fast vollständige Unterdrückung der PQQ-Redoxsignale. Die Vergleichsmessung, gezeigt in Fig. 6 Kurve, (61) wurde vor der Inkubation mit DNase I durchgeführt.

Der Effekt zeigt deutlich, daß die PQQ-modifizierten Oligonukleotid-Stränge durch das Protein geschnitten werden, der zeitliche Verlauf der Reaktion ist verfolgbar, nach 30 Minuten hat das Redoxsignal auf 15-20 %, nach 60 Minuten auf 5-7 % des Referenzsignals abgenommen.

15

**Beispiel 6: Experimente mit Transkriptionsfaktoren:**

Die Beispiele 4 und 5 zeigen sequenzunspezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA, im vorliegenden Beispiel 6 werden demgegenüber sequenzspezifische Wechselwirkungen zwischen redoxmarkierten DNA-Oligonukleotiden und Transkriptionsfaktoren untersucht. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 1 zusammen mit ihren spezifisch anbindenden Transkriptionsfaktoren (TKF) aufgeführt.

Der SP1-Transkriptionsfaktor (als Extrakt aus E-coli) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Suske (Universität Marburg) zur Verfügung gestellt, der Oct2a-TKF wurde von der Firma Roche als Kit mit Puffer-Lösungen ( DIG Gelshift Kit) erworben. HeLa-Scribe Nuclear Extract (Gel Shift Assay Grade, mit SP1-TKF als Bestandteil), ebenfalls als Kit (Gel Shift Assay Systems), und TATA-Binding-Protein wurden von Promega bezogen.

Die Inkubation einer PQQ-Zi-3-Oligonukleotidelektrode, enthaltend ein Oligomer **Seq. ID No. 1** in einer Oct2a-TKF-Lösung (mit 5 µl Oct2a/90 µl Puffer; Zusammensetzung nach Herstellerangabe) ergab nach 60 Minuten bei Raumtemperatur noch keine Änderung des DPV-Redoxsignals (Fig. 7). Kurve (71) in Fig. 7 gibt die Messung vor Zugabe von Oct-II wieder, Kurve (72) zeigt eine

Messung 30 Minuten nach Oct-II Zugabe, Kurve (73) 60 Minuten nach Oct-II

Zugabe, ohne wesentliche Änderung der Signalhöhe. Somit können unspezifische Wechselwirkungen ausgeschlossen werden. Die Inkubation der selben Elektrode in einer SP1-TKF-Lösung (10% Suske-SP1-Extrakt (10 $\mu$ l) in Roche-Kit-Binding Buffer

5 90  $\mu$ l)) ergab nach bereits 30 Minuten Inkubationszeit eine signifikante Verringerung des Redoxsignals (Fig. 8 Kurve (81) Oxidationssignal vor Inkubation mit SP1, Kurve (82) Oxidationssignal nach 30 Minuten Inkubation der Elektrode mit SP1-Lösung), welches nach weiteren 90 Minuten Inkubation weiter deutlich abnahm (Fig. 8 Kurve (83)). Eine quantitative Betrachtung der Peakhöhen- und Flächenverhältnisse ergab  
10 eine Verringerung des Signals auf 50 % nach der ersten Inkubation und einer weitere Verringerung auf 30-35 % nach der zweiten Inkubationsphase.  
Während Oct2a keine Änderung des Redoxverhaltens der SP1-spezifischen Oligonukleotid-Monoschichtelektrode hervorruft, wird der Stromfluß bei der  
15 Inkubation mit SP1-Transkriptionsfaktor deutlich verringert. Somit ist die spezifische Wechselwirkung zwischen dem SP1-TKF und den Oligonukleotidsträngen (Zi-3 Seq. ID No. 1 hat eine SP1-spezifische Erkennungssequenz, alternativ wurde Zi-5 Seq. ID No. 3 verwendet) nachgewiesen.

Zusätzlich wurden Experimente mit Ferrocenessigsäure modifzierten DNA-Sonden

20 durchgeführt. Die DNA-Elektroden wurden nach Beispiel 2 Methode B hergestellt und auf die Goldelektrode aufgebracht. Die SP1 spezifische Probe (Zi-3 Seq. ID No. 1) wurde mit HeLa-Scribe Nuclear Extract (5,5 mg/ml Gel Shift Assay Grade, Promega) analog der Promegavorschrift (60  $\mu$ l Wasser 20  $\mu$ l 5x Gel Shift Binding Buffer, 20  $\mu$ l Nuclearextract ) für 90 Minuten inkubiert. Infolge dessen wurde eine  
25 deutliche Abnahme (Größenordnung 45-50 %) des Redoxsignals (Fig. 9 Kurve (92)) im Vergleich zur Referenzmessung vor der Inkubation (Fig. 9 Kurve (91) detektiert.

Analog wurde das Experiment mit TATA-Binding-Protein (10 fpu, Promega 10 $\mu$ l))

durchgeführt. Bei Verwendung von Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden mit der

30 Sequenz Zi-3 (Tabelle 1, Seq. ID No. 1) wurde eine geringe unspezifische Abnahme des Redoxpeaks (Fig. 10, Kurve (102)) gegenüber der Referenzmessung vor der Inkubation (Fig. 10, Kurve (101)) festgestellt. Wurde eine TATA-spezifische Sequenz (Zi-4 Seq. ID No. 2, Tabelle 1) mit dem TATA-Binding-Protein (10 fpu) für 40 und 70 Minuten inkubiert, war eine deutliche Abnahme auf 75 % bzw. 60 % des

34

Ausgangssignals zu beobachten (Fig. 11 Kurve (112) nach 40-minütiger Inkubation, Kurve (113) nach 70-minütiger Inkubation, Kurve (111) Referenzmessung vor Inkubation mit TATA-Binding-Protein). Das Kontrollexperiment mit Nuclearextract und einer TATA- spezifischen DNA-Probe (Zi-4 Seq. ID No. 2 (Tabelle 1)) führte nur 5 zu einer Änderung der Peakform (Fig. 12, Kurve (121) zeigt das Redoxsignal vor der Inkubation, Kurve (122) zeigt das Redoxsignal nach 30-minütiger Inkubation mit einer HeLa-Zellextrakt-Lösung) und nicht zu einer Verminderung des Redoxsignals.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluß von TATA-Binding-Protein (TFIID) 10 auf den Elektronentransfer in immobilisierten Oligonukleotiden mit spezifischer Erkennungssequenz (Zi-4 Seq. ID No. 2) untersucht.

Dazu wurde eine gereinigte Goldelektrode mit 100µM Zi-4-Ferrocenessigsäure in 0,9M Phosphatpuffer (+ 1mM DTT), Inkubationszeit: 4 Stunden bei 4°C behandelt.

15 Die Monoschicht-Lücken werden mit Mercaptohexanol (1mM Lösung in H<sub>2</sub>O), 1 Stunde bei RT passiviert.  
Die Messung erfolgt in einer Elektrolytlösung (20 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0) mit Hilfe der DPV (Pulshöhe 25mV, Vorschubgeschwindigkeit 10mV/s, Pulsdauer 20ms, Schrittweite 500ms, Potential gegen Ag/AgCl (3M NaCl)).

20 Die Inkubation der Elektrode in reinem GelShift-Binding-Buffer (Promega) dient zur Ausführung von Kontrollmessungen, der Anteil an TFIID-Protein in der Inkubationslösung wird variiert (von 1µl TFIID + 90µl Binding Buffer bis 10µl TFIID + 90µl Binding Buffer) und die entsprechende Änderung des elektrochemischen 25 Signals bestimmt.)

Der Einfluß des reinen Binding Buffers auf die Höhe der DPV-Redoxpeaks ist vernachlässigbar. (Fig. 13, Kurve (131) zeigt das Ferrocen-Reduktionssignal aus der Referenzmesung (nach 30 Minuten Inkubation mit Binding Buffer) und Kurve (132) das Redoxsignal der Elektrode nach weiteren 20 Minuten Inkubation mit Binding- 30 Buffer), die Abnahme der Signalhöhen ist sehr gering. Nach 20-minütiger Inkubation der Elektrode in TFIID-Proteinlösung (1µl TFIID+90µl Binding Buffer) ergibt sich eine signifikante Abnahme der Signalhöhen im DPV (Fig. 13, Kurve (133)), welche auf spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Restriktionsenzym und der Bindungsstelle des Oligonukleotidstranges zurückzuführen ist.

35

Eine Erhöhung der Enzymkonzentration hat eine stärkere Abnahme des Signals bei gleicher Inkubationszeit zur Folge. Fig. 13, Kurve (137) zeigt den Effekt einer 20-minütigen Inkubation der Elektrode in 5µl TFIID + 90µl Binding Buffer auf das Reduktionssignal, Kurve (138) zeigt das entsprechende Signal nach 20-minütiger

5 Inkubation in 10µl TFIID + 90µl Binding Buffer).

Neben dem Konzentrationseffekt des Transkriptionsfaktors konnte auch die zeitliche Abhängigkeit der Anbindung des Transkriptionsfaktors TFIID an die Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden gemessen werden. So sinkt das Reduktionssignal einer Lösung aus 1µl TFIID + 90µl Binding Buffer nach 40-minütiger Inkubation weiter ab

10 (Fig. 13, Kurve (134) danach hat sich unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ein Gleichgewicht eingestellt, die Signalhöhe ändert sich im zeitlichen Verlauf nicht weiter (Fig. 13, Kurve (136) zeigt das Reduktionssignal einer Lösung aus 1µl TFIID + 90µl Binding Buffer nach 70-minütiger Inkubation, Kurve (135) nach 160-minütiger Inkubation). Fig. 13, Kurve (139) zeigt die Zunahme der Bindungsereignisse aus

15 einer Lösung aus 10µl TFIID + 90µl Binding Buffer nach insgesamt 40-minütiger Inkubation gegenüber der 20-minütigen Inkubation der gleich konzentrierten Lösung (Kurve (138)).

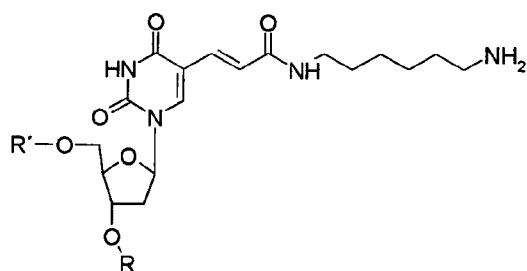
36

Tabelle 1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide (Interactiva, Ulm, D)

Oligo	Sequenz (5'-> 3')	spezifisch für
Zi-3	ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG CTT XTT GCT CGC CCC GCC CCG ATC GAA T <b>(Seq.ID No. 1)</b>	Sp1
Zi-4	GCA GAG CAT ATA AGG TGA GGT AGG ATT TXT TCC TAC CTC ACC TTA TAT GCT CTG C <b>(Seq. ID No. 2)</b>	TATA
Zi-5	ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG CTT TTX GCT CGC CCC GCC CCG ATC GAA T <b>(seq. ID No. 3)</b>	Sp1
Zi-6	GCA GAG CAT ATA AGG TGA GGT AGG AXT TTT TCC TAC CTC ACC TTA TAT GCT CTG C <b>(Seq. ID No. 4)</b>	TATA

In den Oligomersequenzen in Tabelle 1 steht X für einen käuflich erhältlichen

5 Aminomodifier dT-Baustein (Formel I), der am 5'-Ende des Oligomers liegende Nukleotidbaustein ist am C6-Thiol-modifiziert (erhältlich von der Firma Interactiva).



Formel I

Patentansprüche :

37

1. Nukleinsäure-Sonden enthaltend eine an, eine leitfähige Oberfläche gebundene, zumindest teilweise doppelsträngige Nukleinsäuresequenz an die mindestens 5 eine Elektronen-Donor-Einheit oder mindestens eine Elektronen-Akzeptor- Einheit gebunden ist.
2. Nukleinsäure-Sonden nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die angebundenen Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden aus zwei komplementären 10 Nukleinsäuremolekülen zusammengesetzt sind.
3. Nukleinsäure nach Ansprüche 1 dadurch gekennzeichnet, daß die angebundenen Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden aus 15 Nukleinsäuresequenzen bestehen, die selbsterkennende Domänen enthalten.
4. Nukleinsäure-Sonden nach einem der Ansprüche 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß die doppelsträngigen Nukleinsäure-Sonden die gleiche Nukleinsäuresequenz besitzen.
- 20 5. Nukleinsäure-Sonden nach einem der Ansprüche 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß die doppelsträngigen Nukleinsäure-Sonden unterschiedliche Nukleinsäuresequenzen besitzen.
- 25 6. Nukleinsäure-Sonden nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß die doppelsträngigen Nukleinsäure-Sonden auf einer leitfähigen Array-Oberfläche aufgebracht sind.
- 30 7. Nukleinsäure-Sonden nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß die doppelsträngigen Nukleinsäure-Sonden auf einer unstrukturierten leitfähigen Oberfläche aufgebracht sind.
8. Nukleinsäure-Sonden nach einem der vorherigen Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden durch Brückenbindungen stabilisiert sind.

9. Nukleinsäure-Sonden nach einem der vorherigen Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden durch Disulfidbrücken stabilisiert sind.
- 5
10. Nukleinsäure-Sonden nach einem der vorherigen Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die doppelsträngige Nukleinsäure-Sonden Doppelstrang-DNAs, Doppelstrang-RNAs oder DNA-RNA-Hybride enthalten.
- 10
11. Nukleinsäure-Sonden nach einem der vorherigen Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß regenerierbare und/oder induzierbare Elektronen-Donor- oder Elektronen-Akzeptor-Einheiten an der Nukleinsäure kovalent angebunden sind.
- 15
12. Aggregate enthaltend Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden gemäß einem der vorherigen Ansprüchen 1 bis 11 und Substanzen, die aus der Gruppe der mit doppelsträngigen Nukleinsäuren unmittelbar interagierenden Substanzen ausgewählt sind.
- 20
13. Aggregate nach Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß die unmittelbar interagierende Substanz ein Protein und/oder ein Peptid und/oder eine einzelsträngige und/oder eine doppelsträngige Nukleinsäure und/oder ein Mimetika und/oder ein interkalierende und/oder eine nukleinsäureschädigende Substanz und/oder ein Cytostatika ist.
- 25
14. Aggregate nach Anspruch 12 oder 13 dadurch gekennzeichnet, daß das Aggregat weitere mittelbar interagierende Substanzen enthält.
15. Verfahren zur Detektion von Wechselwirkungen zwischen doppelsträngigen Nukleinsäuren und damit interagierenden Substanzen dadurch gekennzeichnet,
- 30
- daß
  - a) Sonden gemäß der Ansprüche 1 bis 11 einem Reaktionsmedium ausgesetzt werden und
  - b) die erzeugte Elektronenflußänderung durch die Sonden gemessen wird.

39

16. Verfahren nach Anspruch 15 dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium eine Lösung ist, die mindestens eine interagierende Substanzen enthält.

5

17. Verfahren nach Anspruch 16 dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium eine Lösung ist, die mindestens eine interagierende Polymerasen, Transkriptionsfaktoren, Repressoren, Enzyme und/oder deren Inhibitoren und/oder Aktivatoren und/oder Mimetika und/oder interkalierende und/oder nukleinsäureschädigende Substanzen und/oder Cytostatika enthält.

10

18. Verfahren nach Anspruch 15 bis 17 dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium einzel- und/oder doppelsträngige Nukleinsäuren enthält.

15

19. Verfahren nach Anspruch 15 dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium DNA-schädigende oder karzinogene Substanzen enthält.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19 dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium eine wässrige, salzhaltige Lösung ist.

20

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 20 dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionslösung gepuffert ist.

25

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 21 dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion bei einer Temperatur zwischen 4 und 40 °C stattfindet.

23. Verwendung der Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Detektion von Wechselwirkungen, von Gleichgewichtskonstanten, von kompetitiven Effekten oder

30

Reaktionsgeschwindigkeiten, zwischen doppelsträngigen Nukleinsäuren und mit ihnen unmittelbar und/oder mittelbar interagierenden Substanzen.

40

24. Analytikum enthaltend Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden gemäß den Ansprüchen 1 bis 11 zur Identifikation von unmittelbar und mittelbar auf die Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonde einwirkenden Faktoren.

5 25. Analytikum enthaltend Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden gemäß den Ansprüchen 1 bis 11 zur Identifikation von Nukleinsäure-Sequenzen die mit unmittelbar oder mittelbar interagierenden Substanzen wechselwirken.

26. Verfahren zur Herstellung von Doppelstrang-Nukleinsäure-Detektoren  
10 umfassend:

- a) die Synthese einer einzelsträngigen Nukleinsäure,
- b) die intermolekulare Hybridisierung mit einer eine komplementäre Domäne enthaltende Nukleinsäure,
- c) die kovalente Anbindung der Elektronen-Donor-Einheiten oder Elektronen-  
15 Akzeptor-Einheiten an die Nukleinsäure und
- d) die kovalente Anbindung der Nukleinsäure an eine leitfähige Oberfläche.

27. Verfahren zur Herstellung von Doppelstrang-Nukleinsäure-Detektoren  
20 umfassend:

- e) die Synthese einer einzelsträngigen, über eine Brücke getrennten selbsterkennende Domänen enthaltenden Nukleinsäure,
- f) die intramolekulare Hybridisierung der selbsterkennenden Domänen der einzelsträngigen Nukleinsäure,
- g) die kovalente Anbindung der Elektronen-Donor-Einheiten oder Elektronen-  
25 Akzeptor-Einheiten an die Nukleinsäure und
- h) die kovalente Anbindung der Nukleinsäure an eine leitfähige Oberfläche.

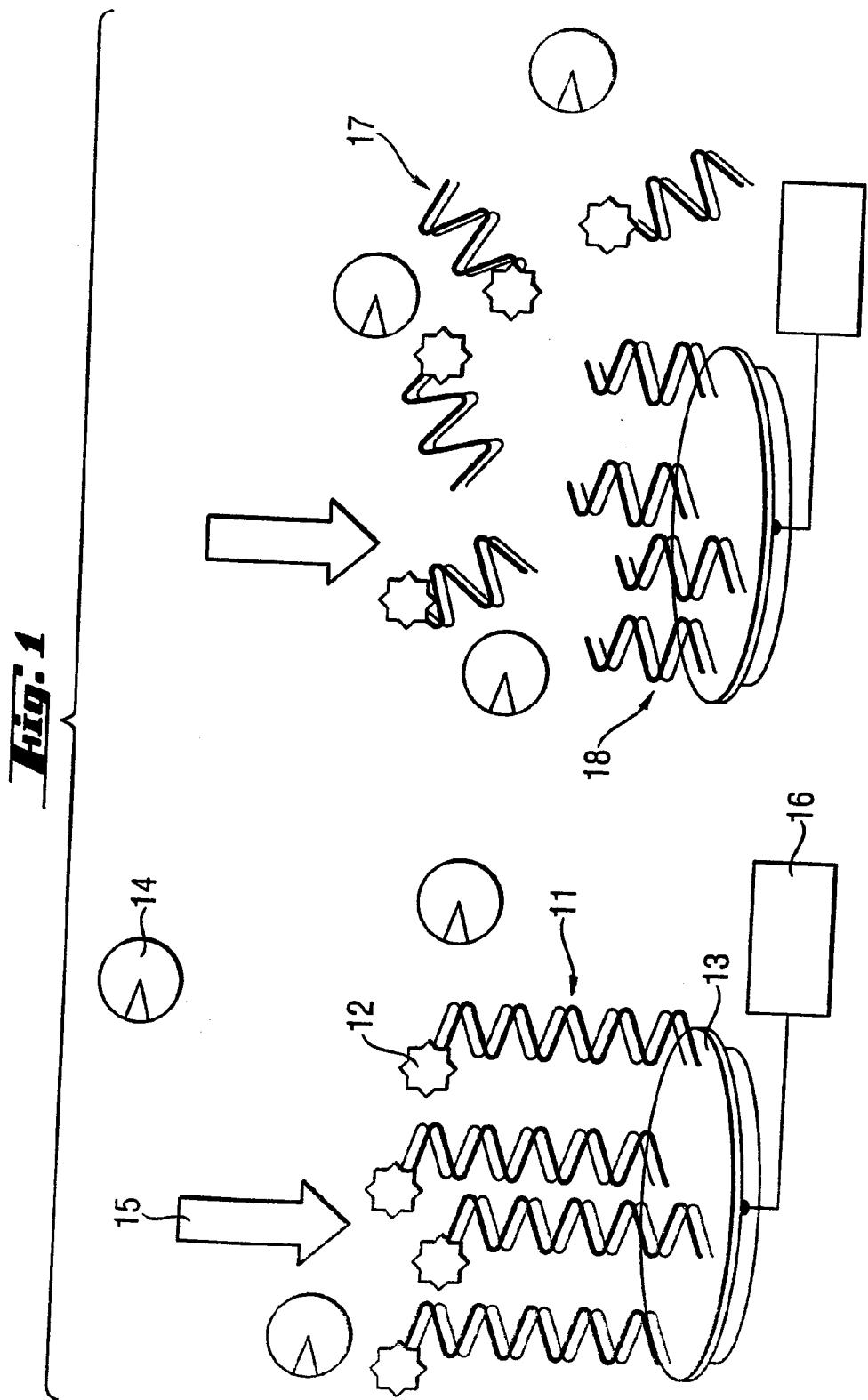
28. Verfahren zur Herstellung von Doppelstrang-Nukleinsäure-Detektoren gemäß Anspruch 27 dadurch gekennzeichnet, daß die Brücke aus mindestens einem  
30 Nukleotid besteht.

29. Verfahren zur Herstellung von Doppelstrang-Nukleinsäuren gemäß Anspruch 27 dadurch gekennzeichnet, daß eine artifizielle mindestens einatomige Brücke eine Disulfid-, Stilbendicarboxyamid-, Ruthenium-Komplex-, Hexaethylenglycol-,

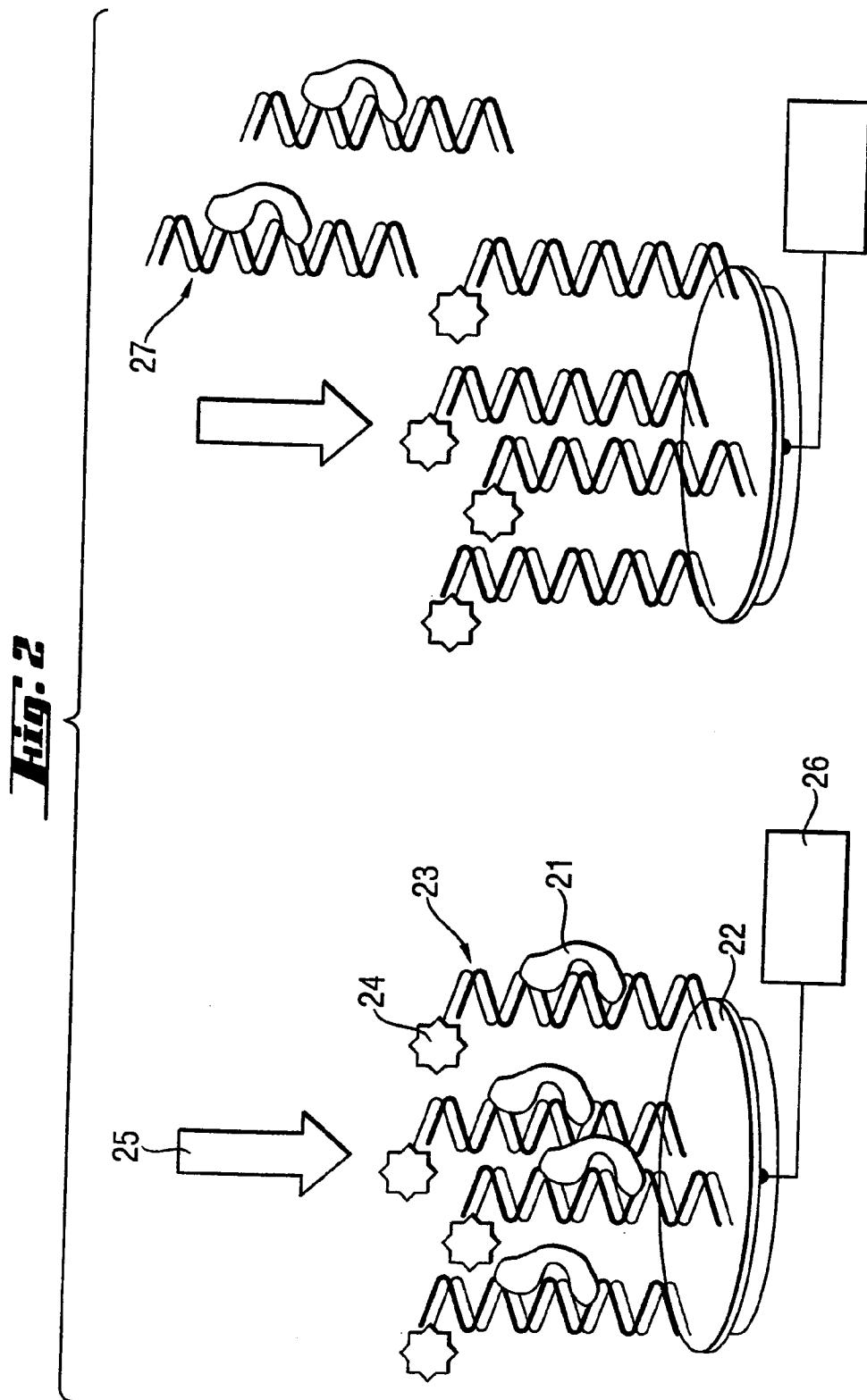
41

Terephthalimid-, verzweigte oder unverzweigte Diol-, 3'-Amino Modifier-CPG  
oder verzweigte Phosphoramidit-Brücke eingeführt wird.

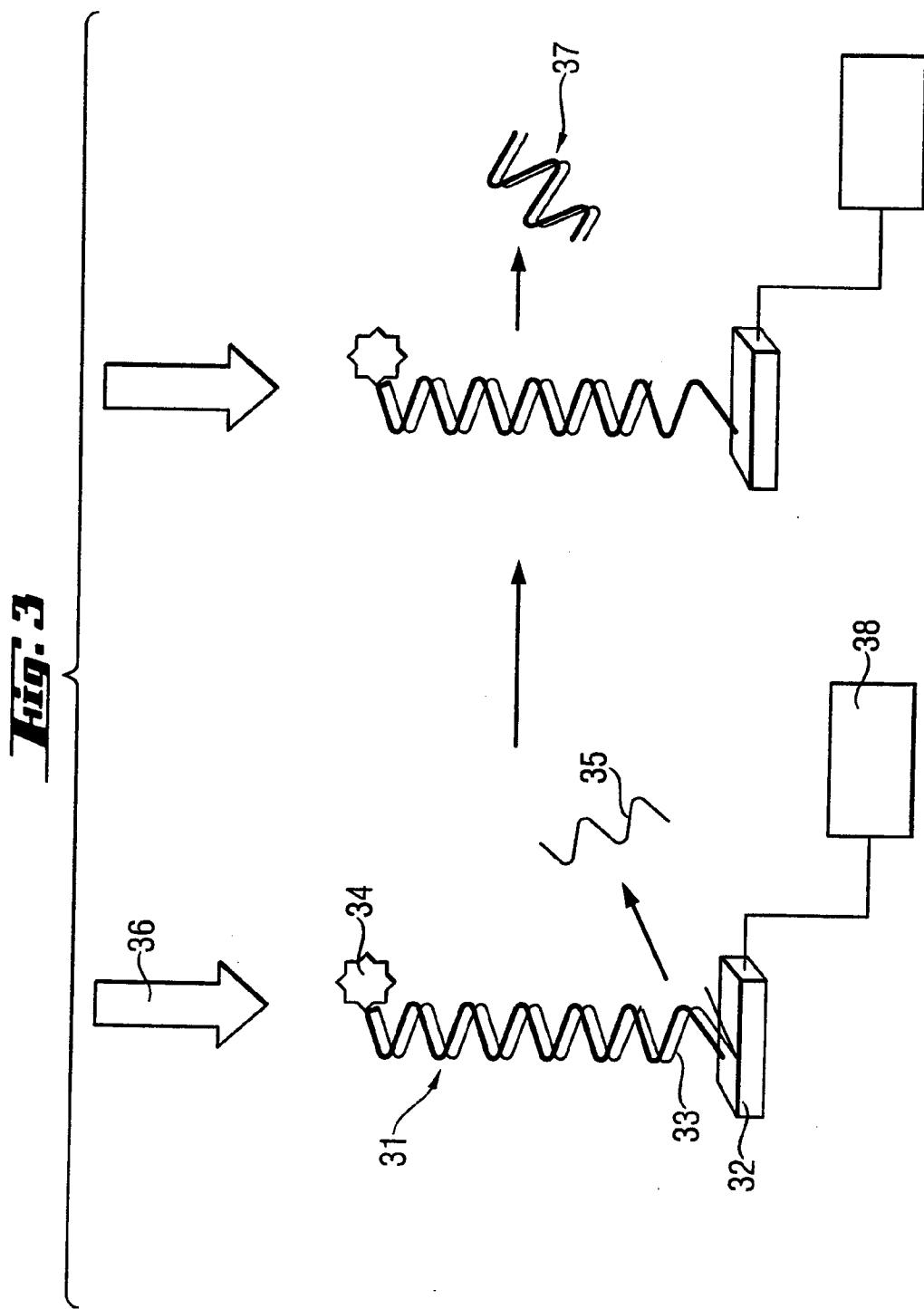
1/13



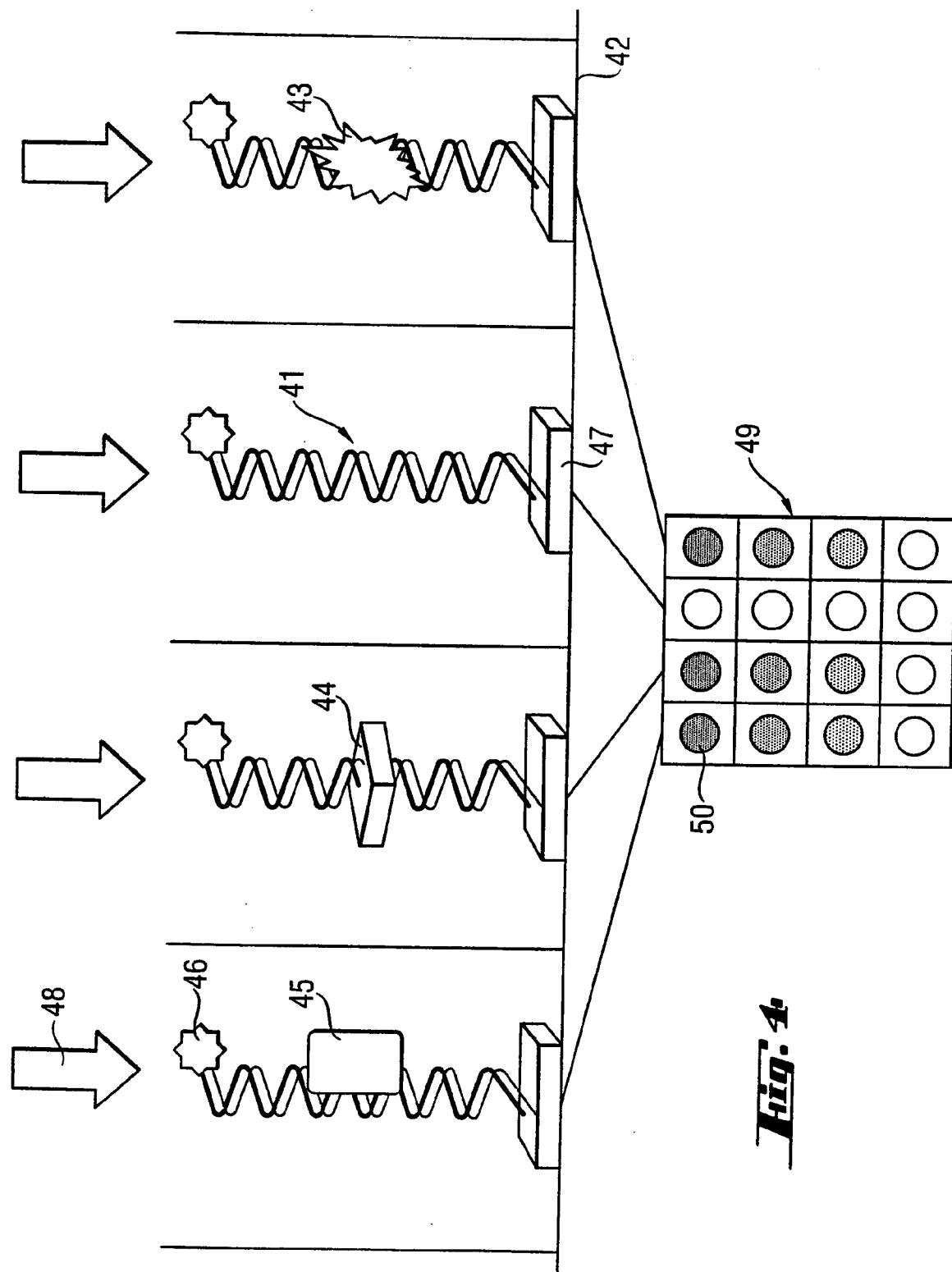
2/13



3/13



4/13



***Fig. 4***

5/13

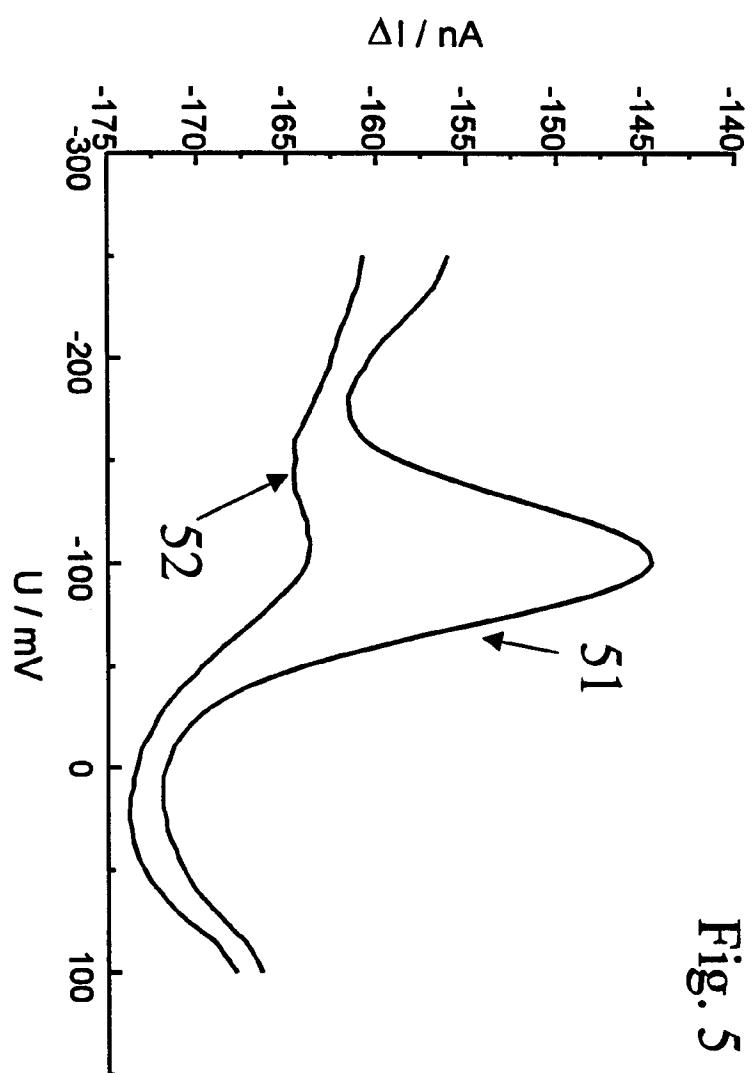


Fig. 5

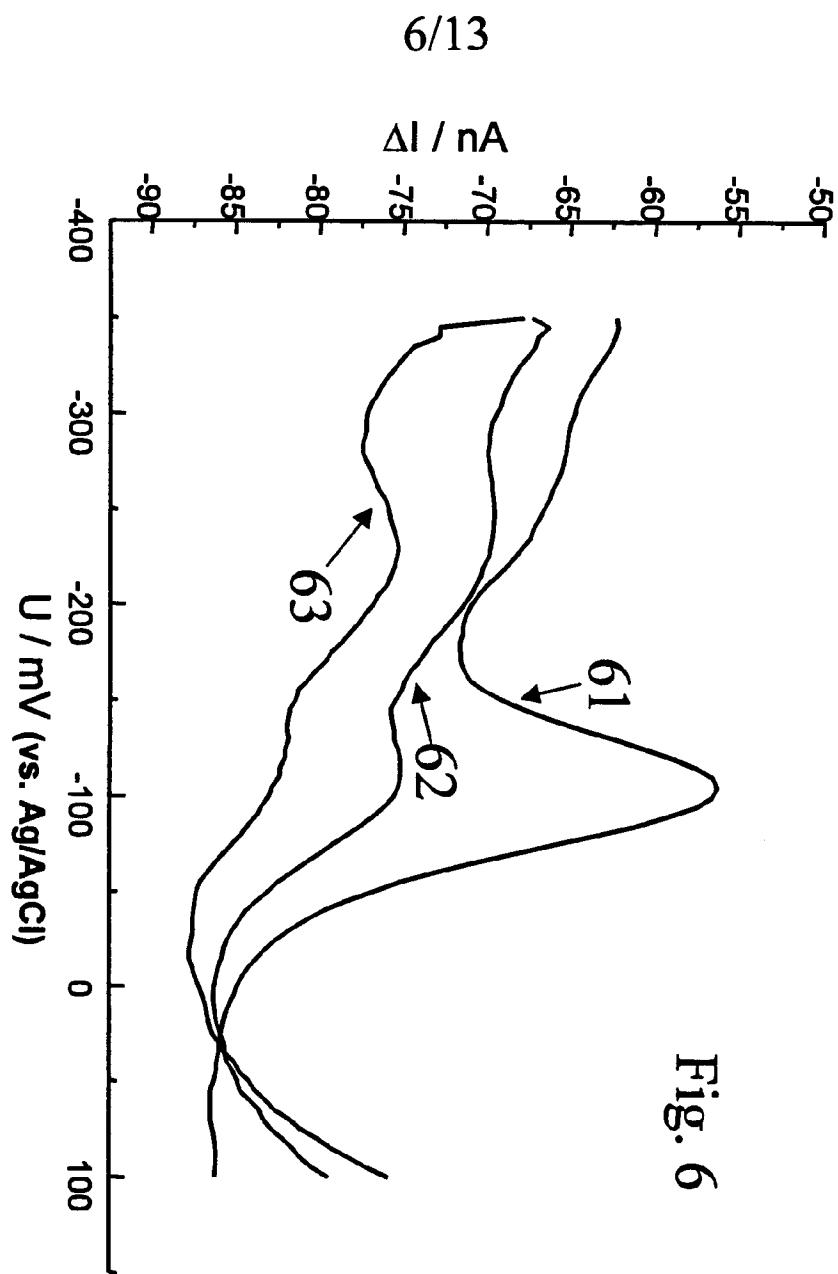
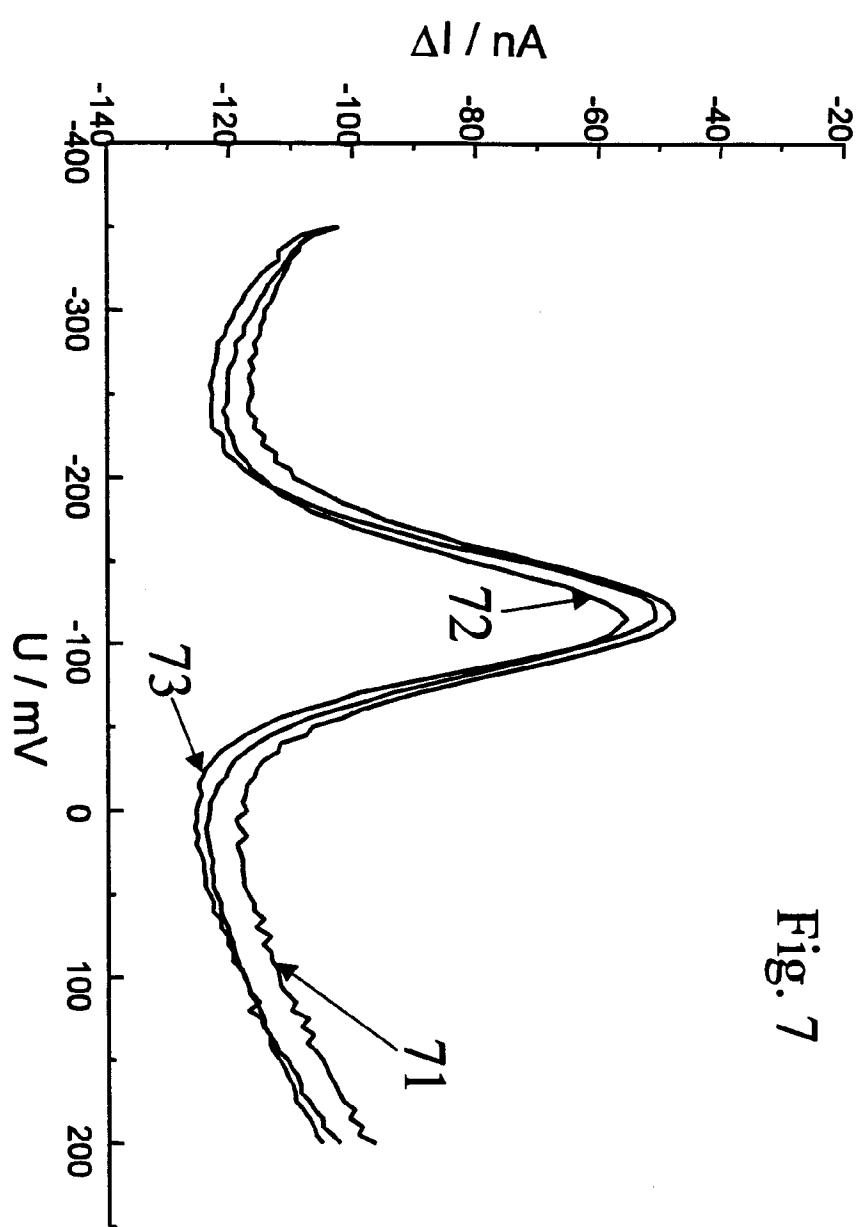


Fig. 6

7/13



8/13

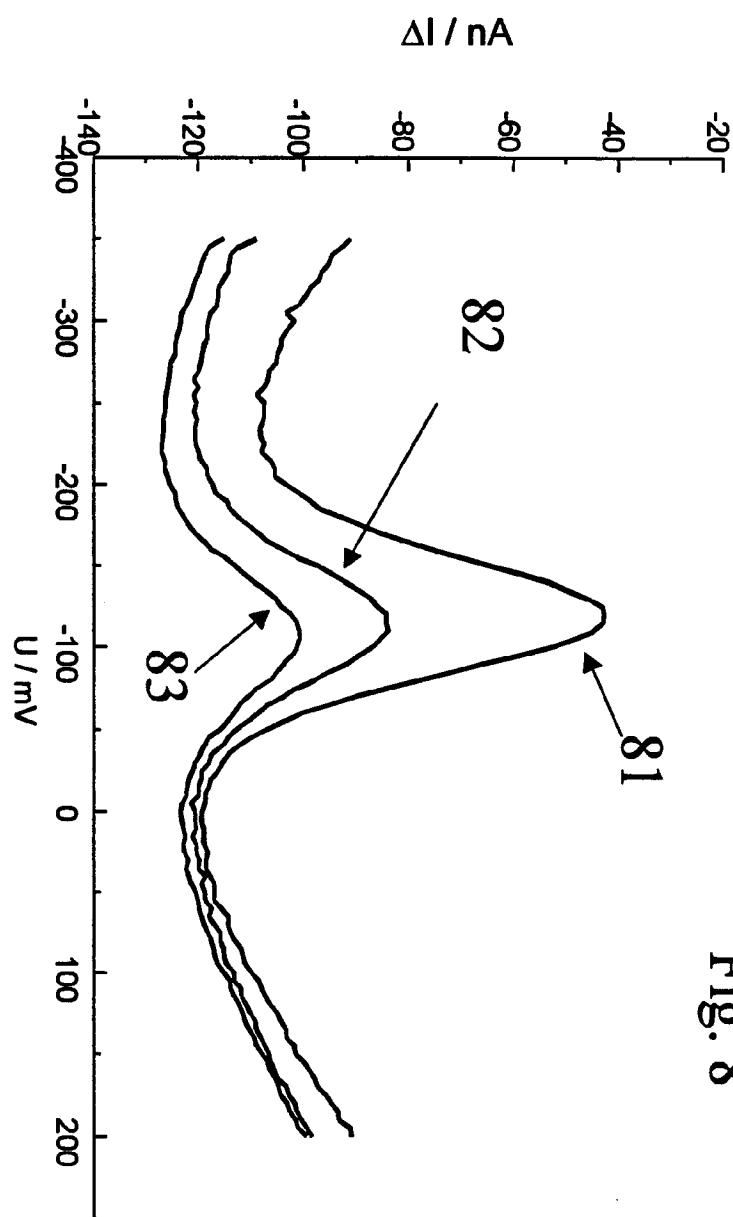


Fig. 8

9/13

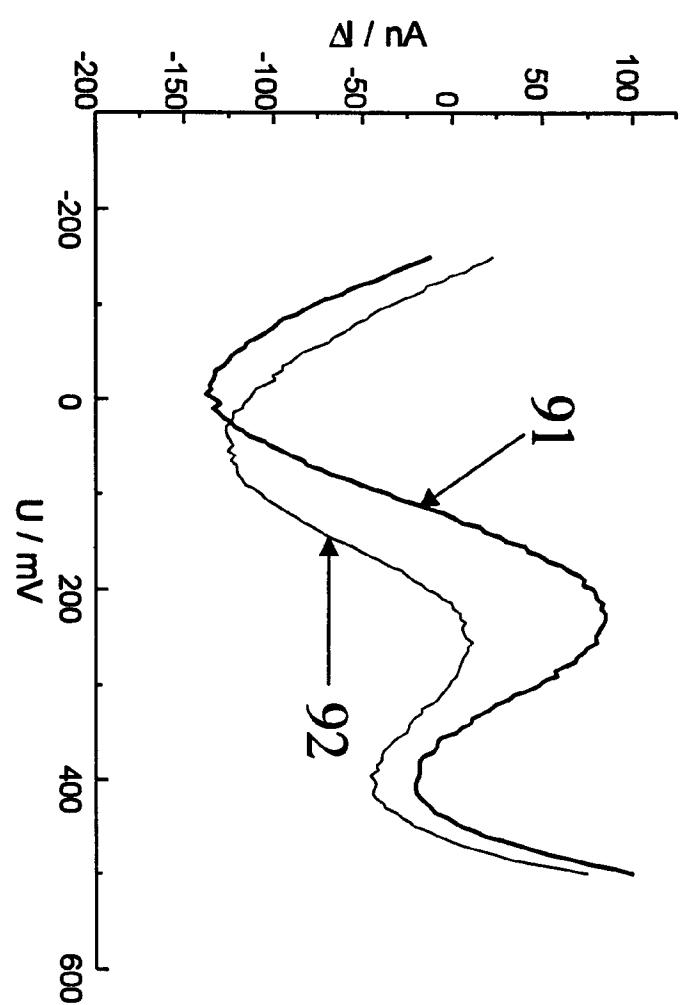


Fig. 9

10/13

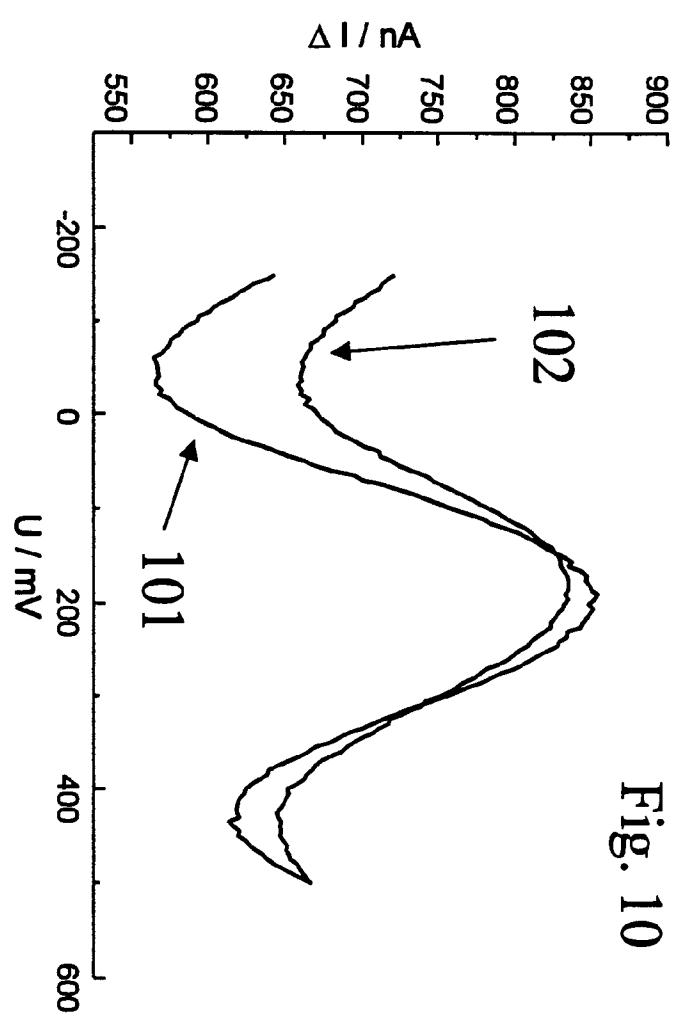


Fig. 10

11/13

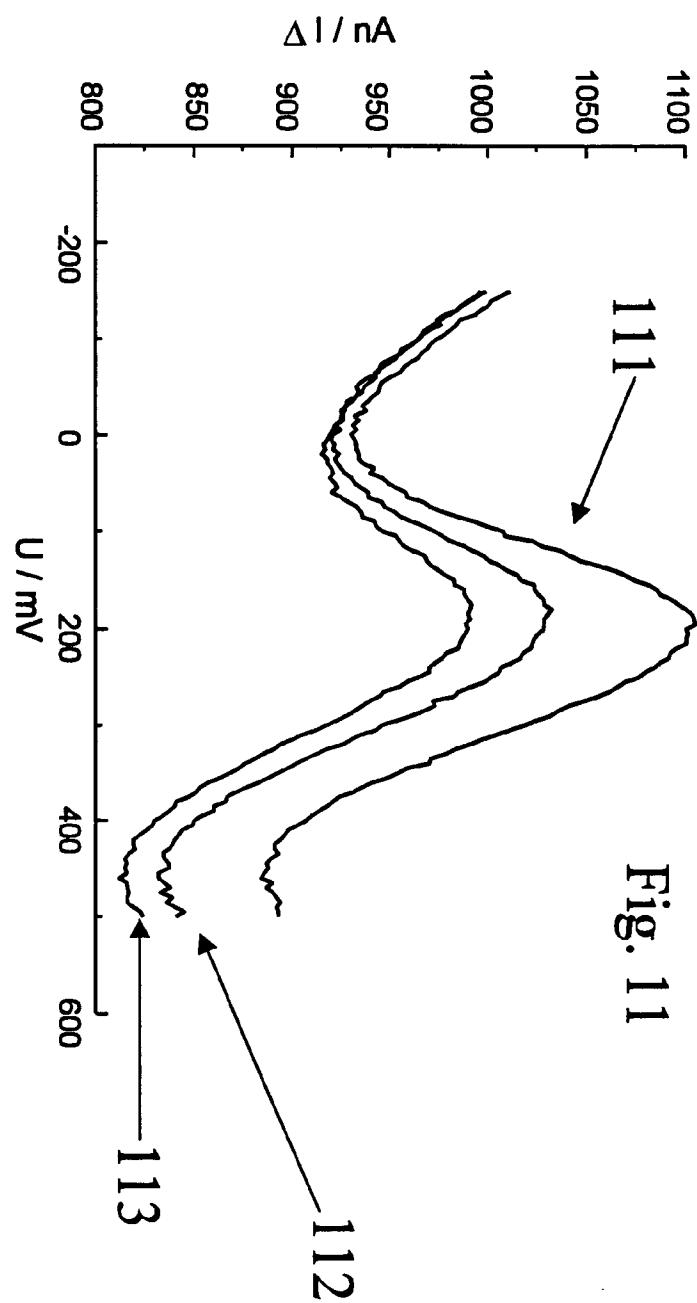


Fig. 11

12/13

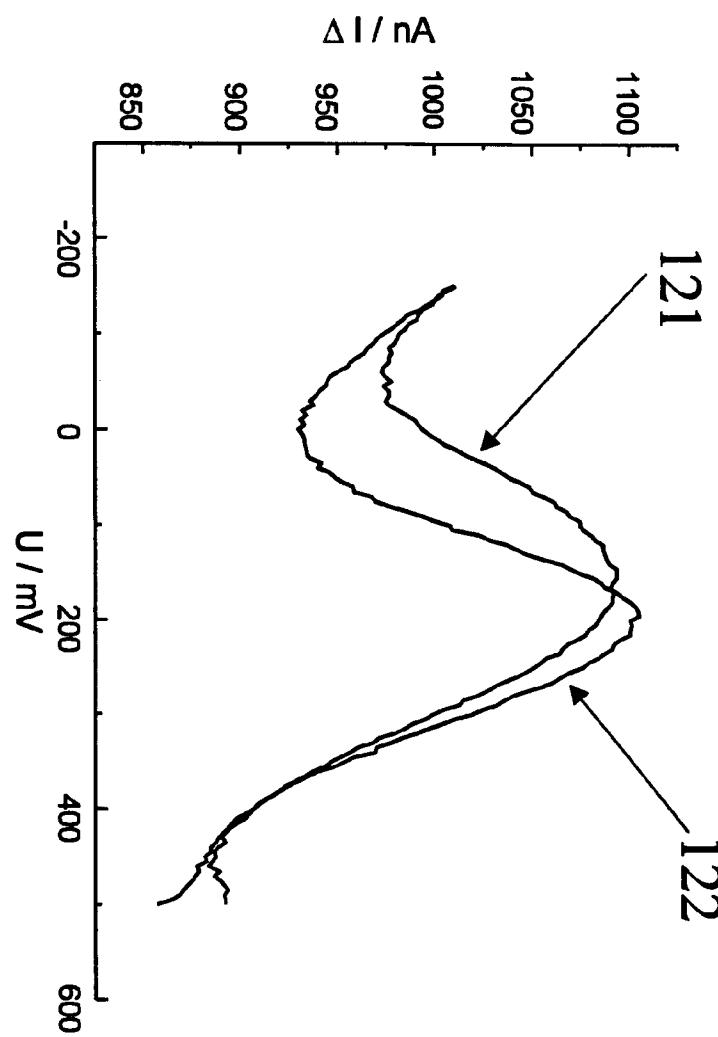
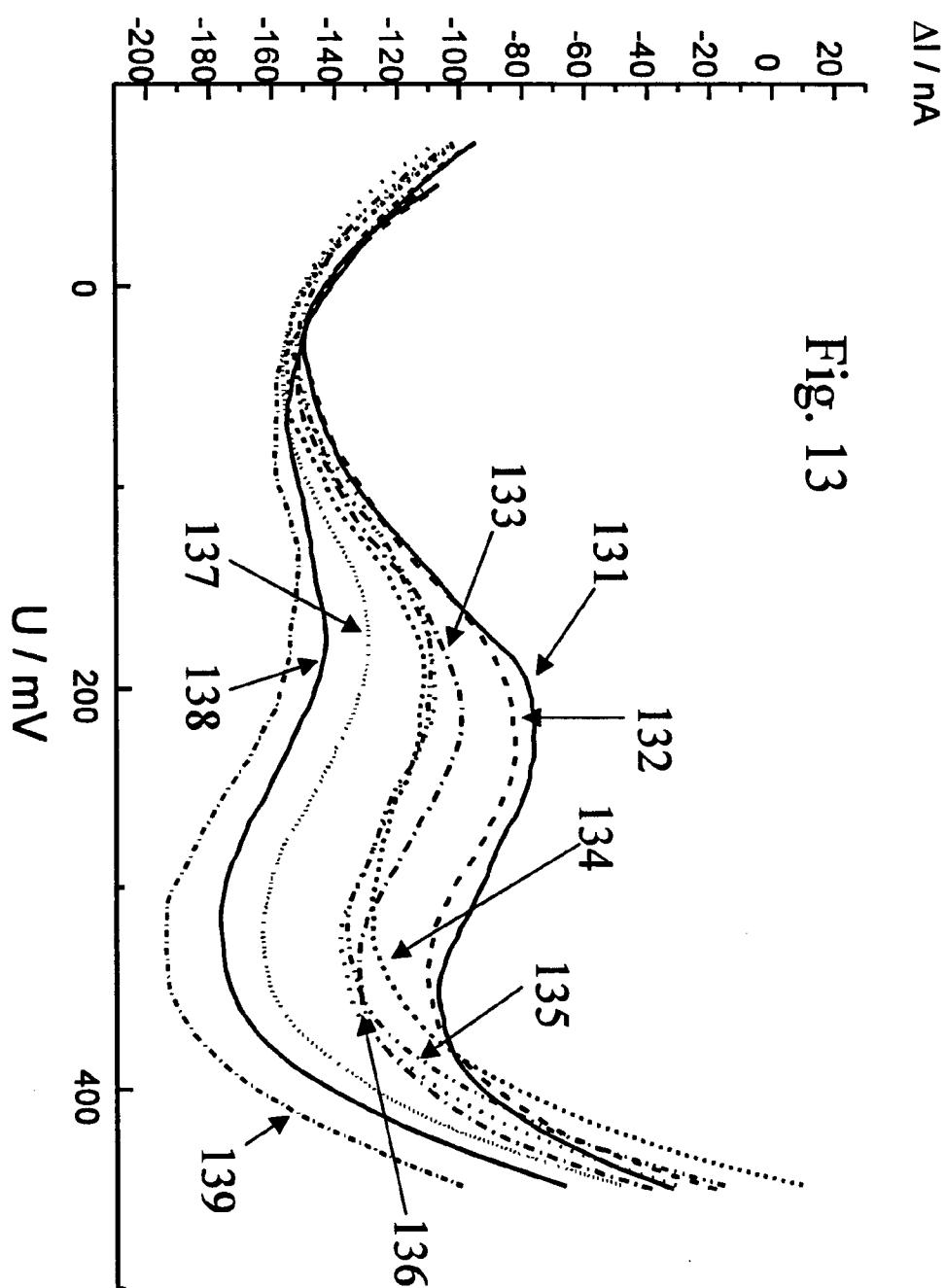


Fig. 12

13/13



## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Research & Technologies GmbH & CO KG

<120> Doppelstrang-Nukleinsäure-Sonden und deren Verwendung

<130> HOE 1999/F 050

<140> 19950969.7-41

<141> 1999-10-22

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 49

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Detektorsequenz mit einem Amino-Modifier

dT-Baustein an Position 25

<400> 1

attcgatcgg ggccgggcga gcttttgct cgcccccggcc cgatcgaat

49

<210> 2

<211> 55

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Detektorsequenz mit einem Amino-Modifier

dT-Baustein an Position 29

<400> 2

gcagagcata taaggtgagg taggattttt tcctacctca ccttatatgc tctgc

55

<210> 3

<211> 49

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Detektorsequenz mit einem Amino-Modifier  
dT-Baustein an Position 27

&lt;400&gt; 3

attcgatcg ggcggggcga gcttttgct cgcccccgc cgcgtcaat

49

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 55

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Detektorsequenz mit einem Amino-Modifier  
dT-Baustein an Position 26

&lt;400&gt; 4

gcagagcata taaggtgagg taggatttt tcctaccta ccttatatgc tctgc

55